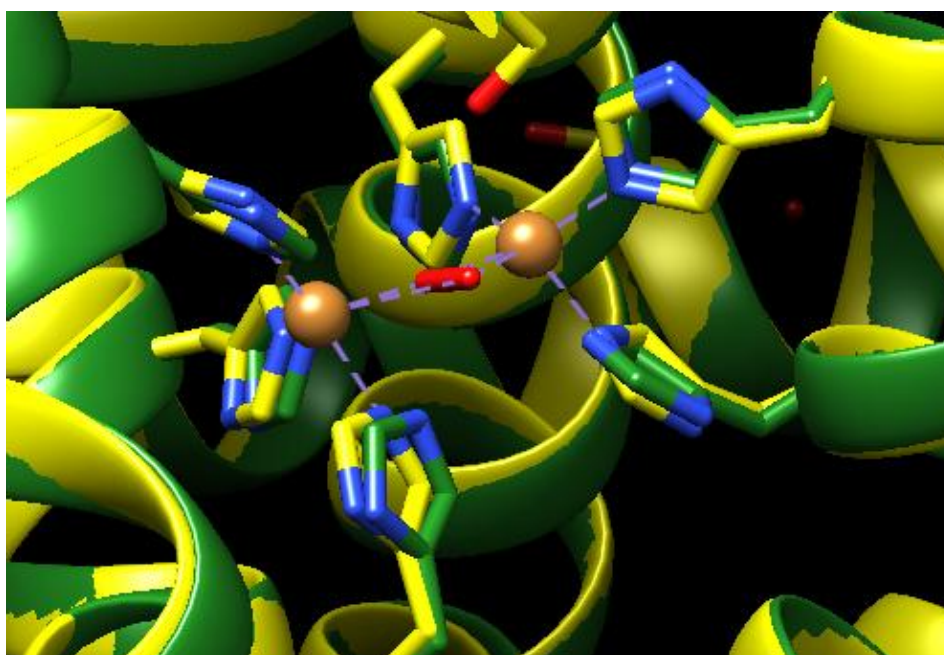


**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ VI: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ενίσχυση της δράσης μονοφαινολάσης
μίας πολυφαινολοξειδάσης του μύκητα
Myceliophthora thermophila με
μεθόδους πρωτεϊνικής μηχανικής**



μ

-

:

,

. .

2016

μ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

[illegible]

2016

μ

μ μ μ *Myceliophthora thermophila* μ

μ .

μ μ $pPICZ^+$ A

DNA μ μ *MtOx60685*. To

L306A (MutOx2) Y296V (MutOx3) μ G292N (MutOx1), PCR, μ

μ μ . μ μ μ -

33 μ *Pichia pastoris* μ μ μ .

μ MtOx, μ μ , μ

μ , μ

μ μ , μ μ μ μ . μ

μ G292N μ

μ / 1,89, μ μ μ μ

μ μ L- .

μ μ L306A Y296V

μ .

μ μ μ μ

μ pH μ μ

, μ . μ

μ μ G292N. μ μ

μ T=60°C

pH μ μ 6-8.

μ μ

Michaelis-Menten μ μ μ 4-

. μ μ
 μ MtOx ($k_{\text{cat}}/K_m=3006,2\pm197,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$),
 μ μ μ MtOx2 ($k_{\text{cat}}/K_m=61,7\pm9,3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).
 , μ ,
 μ μ μ μ
 μ μ μ 187
 S199. μ μ
 μ μ PCR
 . μ μ μ μ μ
 μ μ μ $p\text{CR}^{\text{®}}$ Blunt. μ
 μ μ μ μ *P. pastoris*, μ μ
 μ .

ABSTRACT

The purpose of this specific diploma thesis was the protein engineering of a polyphenol oxidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* towards enhancement of its monophenolase activity.

The recombinated plasmid *pPICZ A* which included the coding sequence of polyphenol oxidase gene *MtOx6068* was used as a template. The different mutations G292N (MutOx1), L306A (MutOx2) and Y296V (MutOx3) were introduced into the plasmid DNA through site-directed mutagenesis, using PCR. The mutated genes were inserted in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* through transformation and accordingly, the mutated proteins were heterologously expressed.

The substrate specificity of the enzyme MtOx, as well as that of the mutated proteins, was examined on a wide range of phenolic substrates. The activities of the examined enzymes in each substrate were determined spectroscopically and found to differ between them, without presenting any special pattern. The ratio of monophenolase/diphenolase activity of enzyme MutOx1 was substantially increased to the value of 1,89, whereas the wild type showed no tyrosinase activity on L-tyrosine. The enzymes which carried the mutations L306A and Y296V respectively presented an enhanced activity towards polyphenolic substrates.

The mutated enzymes were also characterized in terms of pH- and T-optimum, as well as in terms of thermostability. The enzyme MutOx1 proved to be the most thermostable between the four examined proteins. The T-optimum of all the mutated enzymes was 60°C and the pH-optimum was between the values 6-8.

Furthermore the Michaelis-Menten constants of the oxidation of 4-chlorocatechol and catechol catalyzed by the four enzymes were calculated. The highest catalytic efficiency in the substrate 4-chlorocatechol was exhibited by MtOx ($k_{\text{cat}}/K_m=3006,2\pm197,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), whereas in catechol by MutOx2 ($k_{\text{cat}}/K_m=61,7\pm9,3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Following the purpose of enhancing the monophenolase activity of the enzyme MtOx, one more mutation was introduced in the wild type gene, in order to cut out a sequence of 11 amino acids between 187 and S199. The rest gene sequences located

on the right and left side of the corresponding 33 nucleotide- part were amplified and isolated with PCR. They were afterwards combined in one final mutated gene which was used for the recombination of the plasmid *pCR*[®] Blunt. The transformation of the yeast *P. pastoris*, the heterologous expression of the mutated protein (MutOx4) and its characterization are yet to be carried out.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΕΞΕΛΙΞΗ	5
1.1.	Ορισμός και γενικές αρχές	5
1.2.	Κατευθυνόμενη εξέλιξη στο πρωτεϊνικό επίπεδο	6
2.	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	7
2.1.	Εισαγωγή	7
2.2.	Είδη μεταλλάξεων	7
2.3.	Εμφάνιση μεταλλάξεων-Μηχανισμοί	8
3.	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΟΞΕΙΔΑΣΕΣ	12
3.1.	Πολυφαινολοξειδάσες (PPOs)	12
3.2.	Τυροσινάση	13
3.3.	Κατεχολοξειδάση	22
3.4.	Εξειδικευμένη δράση μονοφαινολάσης/ διφαινολάσης- Ερμηνεία	26
3.5.	Κατευθυνόμενη εξέλιξη σε PPOs	30
3.6.	Υποστρώματα- Ονοματολογία	32

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.	ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ	37
2.	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	38
3.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	39
3.1.	Εμπορικά Ένζυμα και αντιδραστήρια	39
3.2.	Αντιβιοτικά	39
3.3.	Θρεπτικά υλικά	40
3.4.	Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer)	42
3.5.	Εκκινητές	42
3.6.	Πλασμιδιακοί φορείς	43
4.	ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ DNA	45
5.	ΜΕΘΟΔΟΙ	46
5.1.	Παρασκευή θρεπτικών υλικών	46
5.2.	Μοριακές τεχνικές	47
5.3.	Τεχνικές παραγωγής και παραλαβής πρωτεΐνης	56

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	77
1.1.	Μεταλλάξεις G292N, L306A και Y296V:.....	77
1.2.	Μετάλλαξη MutOx I178-S199:	78
2.	ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ <i>P. pastoris</i> ..	79
2.1.	Επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης <i>P. pastoris</i> για την παραγωγή της πρωτεΐνης.....	79
2.2.	Υπολογισμός της παραγωγής πρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου της υγρής καλλιέργειας.....	83
3.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	83
3.1.	Προσδιορισμός του μεγέθους της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης	83
3.2.	Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αρχικής PPO και των μεταλλάξεων αυτής	85
3.3.	Δράση σε διαφορετικά υποστρώματα	88
3.4.	Θερμικά χαρακτηριστικά.....	92
3.5.	Βέλτιστη τιμή pH δράσης	95
3.6.	Κινητικές σταθερές.....	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
1.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πηκτή ακρυλαμίδιου SDS- PAGE:.....	103
2.	Κατηγοριοποίηση του ενζύμου:.....	104
3.	Συμπεράσματα σχετικά με την εξελικτική σχέση μικροοργανισμών που παράγουν PPOs:.....	105
4.	Κινητικές παράμετροι:	106
5.	Εξειδικευμένη δράση σε διάφορα υποστρώματα:	107
6.	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης:.....	109
7.	Θερμοσταθερότητα:.....	109
8.	Βέλτιστο pH δράσης:	111
9.	Σύγκριση με την πρωτεΐνη AoCO:	112
10.	Προτάσεις για το μέλλον:.....	113
10.1.	Όσον αφορά το μη μεταλλαγμένο ένζυμο MtOx:	113
10.2.	Όσον αφορά όλα τα εξεταζόμενα ένζυμα MtOx και MutOx1,2 και 3:	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

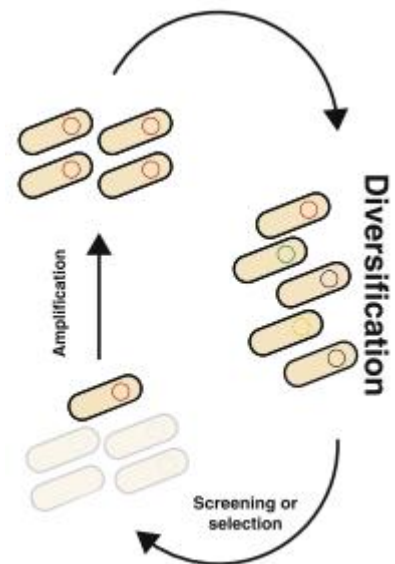
1. ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

1.1. Ορισμός και γενικές αρχές

Η κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution) είναι η διαδικασία με την οποία οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τεχνικές που βασίζονται στην τεχνητή επιλογή (artificial selection) για να τροποποιήσουν τις ιδιότητες ενός οργανισμού ή ενός συστήματος. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην αρχή της φυσικής επιλογής, όπου οι οργανισμοί με πιο ευνοϊκά χαρακτηριστικά επιβιώνουν και αναπαράγονται, ενώ οι λιγότερο ευνοϊκοί εξαφανίζονται. Στην κατευθυνόμενη εξέλιξη, ο άνθρωπος παίζει το ρόλο του φυσικού επιλεκτή, επιλέγοντας τους οργανισμούς που έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και χρησιμοποιώντας τους για να δημιουργήσει την επόμενη γενιά. Η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία, όπως η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η περιβαλλοντική επιστήμη. (Bassalo, Liu, & Gill, 2016a).

Η διαδικασία της κατευθυνόμενης εξέλιξης μπορεί να χωριστεί σε τρεις βασικές φάσεις: επιλογή, αναπαραγωγή και επανάληψη. Στην επιλογή, οι επιστήμονες επιλέγουν τους οργανισμούς που έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια, οι επιλεγμένοι οργανισμοί αναπαράγονται, δημιουργώντας την επόμενη γενιά. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία, όπως η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η περιβαλλοντική επιστήμη. (Cobb, Sun, & Zhao, 2013).

Η διαδικασία της κατευθυνόμενης εξέλιξης μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία, όπως η βιοτεχνολογία, η ιατρική και η περιβαλλοντική επιστήμη. Στην βιοτεχνολογία, η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν οργανισμοί που παράγουν συγκεκριμένα προϊόντα, όπως φάρμακα ή βιοκαύσιμα. Στην ιατρική, η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν οργανισμοί που παράγουν συγκεκριμένα πρωτεΐνες ή αντισώματα. Στην περιβαλλοντική επιστήμη, η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν οργανισμοί που είναι πιο ανθεκτικοί σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά παράγοντες, όπως η αμμοनिα ή η οξυγόνο.



Εικόνα 1. Συνήθης διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης (Bassalo et al., 2016)

1.2. Κατευθυνόμενη εξέλιξη στο πρωτεϊνικό επίπεδο

μ μ μ
 . μ
 μ μ μ , μ μ
 μ . , μ μ
 μ ,
 μ (Uria & Zilda, 2016).
 μ μ μ μ μ
 . μ μ
 μ , μ
 μ . μ
 μ μ μ
 μ , μ μ μ
 (Jäckel, Kast, & Hilvert, 2008).
 μ μ , μ
 μ μ
 μ , μ
 μ μ μ
 (xylose reductase XR) μ D-
 , μ , L-
 Nair Zhao (Nair N.U, Zhao H, 2008). 2016 Nimpiboon et al.
 μ μ μ
Corynebacterium glutamicum (CgAM) μ
 μ μ (Nimpiboon et al., 2016).
 μ μ μ
 μ μ μ .

2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

2.1. Εισαγωγή

Η μεταλλάξη είναι η αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA. Οι μεταλλάξεις μπορούν να προκύψουν από φυσικούς παράγοντες, όπως ακτινοβολία ή χημικά, ή από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Οι μεταλλάξεις έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των οργανισμών, καθώς και στην εμφάνιση ασθενειών. Η μελέτη των μεταλλάξεων είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας του DNA και της κληρονομικότητας. (Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

DNA

2.2. Είδη μεταλλάξεων

Οι μεταλλάξεις μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικά είδη: σημειακές και μετατόμιση. Οι σημειακές μεταλλάξεις αφορούν την αλλαγή ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων, ενώ η μετατόμιση αφορά την αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων λόγω της εισαγωγής ή της διαγραφής τμημάτων του DNA.

2.2.1. Μετάλλαξη σημείου

Η μετάλλαξη σημείου είναι η αλλαγή ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων στο DNA. Αυτή η αλλαγή μπορεί να οδηγήσει στην αντικατάσταση ενός αμινοξέως με έναν άλλο, ή στην διαγραφή ή την εισαγωγή ενός αμινοξέως. Η μετάλλαξη σημείου μπορεί να είναι ομοιόμορφη ή αντιστοίχηση. Η ομοιόμορφη μετάλλαξη σημείου αφορά την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο, ενώ η αντιστοίχηση αφορά την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο, αλλά με διαφορετικό αμινοξύ. Η μετάλλαξη σημείου μπορεί να είναι βλαβερή ή ωφέλιμη. Η βλαβερή μετάλλαξη σημείου μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών, ενώ η ωφέλιμη μετάλλαξη σημείου μπορεί να οδηγήσει στην εξέλιξη των οργανισμών. (Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

2.2.2. Μετάλλαξη εξάλειψης

Η μετάλλαξη εξάλειψης είναι η αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων λόγω της εισαγωγής ή της διαγραφής τμημάτων του DNA. Αυτή η αλλαγή μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών, ή στην εξέλιξη των οργανισμών. Η μετάλλαξη εξάλειψης μπορεί να είναι βλαβερή ή ωφέλιμη. Η βλαβερή μετάλλαξη εξάλειψης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών, ενώ η ωφέλιμη μετάλλαξη εξάλειψης μπορεί να οδηγήσει στην εξέλιξη των οργανισμών.

(Flibotte et al., 2010)

(Michael L. Shuler, Fikret Kargi, 2005).

2.2.3. Μετάλλαξη προσθήκης

 $\mu \quad \mu \quad , \quad \mu$

DNA.

 μ .

2.2.4. Κυκλική μετάθεση (Circular permutation)

$$\mu \qquad \qquad \qquad \mu$$
$$\mu \quad \mu \quad . \quad \mu \quad \mu$$
$$\mu \quad \mu \quad \mu \quad \mu \quad \mu$$

N- C- μ μ

$$\mu \quad \mu \quad \mu \quad \mu .$$
$$\mu \qquad \mu \qquad \qquad \mu \qquad \mu$$
$$\mu \quad . \quad \mu \quad \mu$$
$$\mu \quad \mu \quad . \quad \mu$$
 μ μ

μ μ (Pierre, Shah, Xiao, & Kim, 2015).

2.3. Εμφάνιση μεταλλάξεων-Μηχανισμοί

μ μ μ DNA

$$, \quad \mu, \mu : \quad$$

2.3.1. Τυχαία μεταλλαξιγένεση με error-prone PCR

$$\mu \qquad \qquad \qquad \mu \qquad \qquad \qquad \mu \qquad \qquad \qquad \mu$$
$$\mu_{\text{max}} = 0.0001 \text{ s}^{-1}, \quad \mu_{\text{min}} = 0.00001 \text{ s}^{-1}$$

μ DNA μ μ μ

μ μ DNA(error- prone PCR). μ Mn²⁺

dNTPs μ μ PCR, μ μ μ

μ (. . Taq polymerase) (Nimpiboon et al., 2016).

μ DNA PCR μ

$$\mu \quad \text{DNA} \quad \mu \quad \mu \quad \mu$$

2.3.2. Τυχαία μεταλλαξιγένεση με χρήση χημικών μεταλλαξογόνων παραγόντων

[illegible]

2.3.3. Αναδιάταξη του DNA (DNA shuffling)

μ μ DNA μ .
μ μ μ μ ,
μ μ , μ μ
μ μ . μμ DNA μ
μ « μ » μ DNA μ
μ , μ μ . μ μμ
μ , μ μ μ
μ μ μ μ μ
μ μ DNA. DNA
μ μ , μ
μ μ μ

« μ » μ (F. H. Arnold, G. Georgiou, 2003).
 DNA μ
 μ (Bassalo, Liu, & Gill, 2016b).

2.3.4. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (*site-directed mutagenesis*)

μ , μ μ
 μ μ , μ μ .
 DNA μ μ μ
 μ μ μ . μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ μ μ
 (primers).
 μ μ μ μ μ
 μ μ . , μ
 DNA, μ μ μ
 μ μ μ
 (H. Robert Horton, Laurence A. Moran et al., 2008).
 . DNA
 . μ
 μ μ , , . μ
 μμ DNA μ
 μ μ μ μ
 (Bruce Alberts, Dennis Bray et al., 2011). DNA
 μ μ .
 μ
 μ μ DNA.
 μ μ μ
 μ μ ,
 μ μ (CP) μ .
 μ μ μ
 , μ μ
 μ μμ DNA.

μ μ μ .

,

μ

(μ μ μ μ μ ,

μ μ DNA μ μ .).

μ μ μ μ μ

μ (mutagenic PCR), μ

μ μ μ μ primer.

μ μ

(Bassalo et al., 2016a).

μ

μ μ μ

μ . μ

μ μ

μ : MAGE (Multiplex Automated Genome Engineering) CRISPR- Cas(Bassalo et al., 2016a).

3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΟΞΕΙΔΑΣΕΣ

3.1. Πολυφαινολοξειδάσες (PPOs)

3.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

(Kaintz, Mauracher, & Rompel, 2014).

3.1.2. Δομικά χαρακτηριστικά

PPOs
 , μ μ C-
 μ N-
 μ .
 μ μ (Fronk
 et al., 2015).
 μ , C-
 μ « μ ».
 in vivo μ
 μ μ C-
 μ μ
 , μ
 .
 μ μ μ .
 , μ , PPOs μ
 μ μ μ μ
 His. C- μ 16-18 kDa,

μ (Kaintz et al., 2014). μ

μ

C- μ μ . μ μ « » PPOs

(Hakulinen, Gasparetti, Kaljunen, Kruus, & Rouvinen, 2013).

3.2. Τυροσινάση

3.2.1. Δράση ενζύμου

« » μ μ μ

. μ

μ μ .

- μ - (2.)

-

(3.).

μ (1)

(2) (Bijelic, Pretzler, Molitor, Zekiri, & Rompel, 2015).

μ , μ μ ,

μ μ ,

, - , μ μ , μ ,

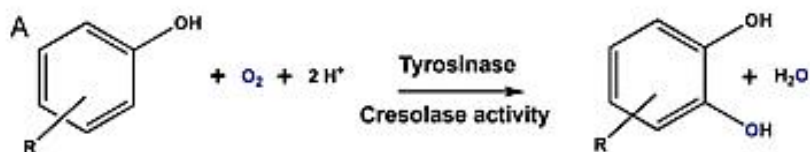
μ μ . μ μ

μ μ (Faccio, Kruus, Saloheimo, & Thöny-Meyer, 2012).

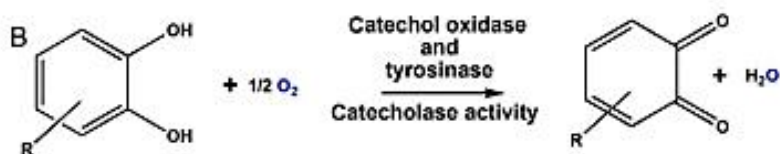
, μ (Kaintz et al.,

2014), μ μ ,

Bacillus megaterium (Goldfeder, Kanteev, Adir, & Fishman, 2013).



Εικόνα 2 . Δράση μονοφαινολάσης (Kainz et al., 2014)



Εικόνα 3. Δράση διφαινολόασης (Kainz et al., 2014)

3.2.2. Καταλυτικός μηχανισμός

(Sendovski, Kanteev, Ben-Yosef, Adir, & Fishman, 2011).

His μ μ Cu(A) Cu(B)

μ ,

μ (Olivares & Solano, 2009).

K μ

μ . μ

«deoxy» μ μ μ μ

μ . μ μ μ

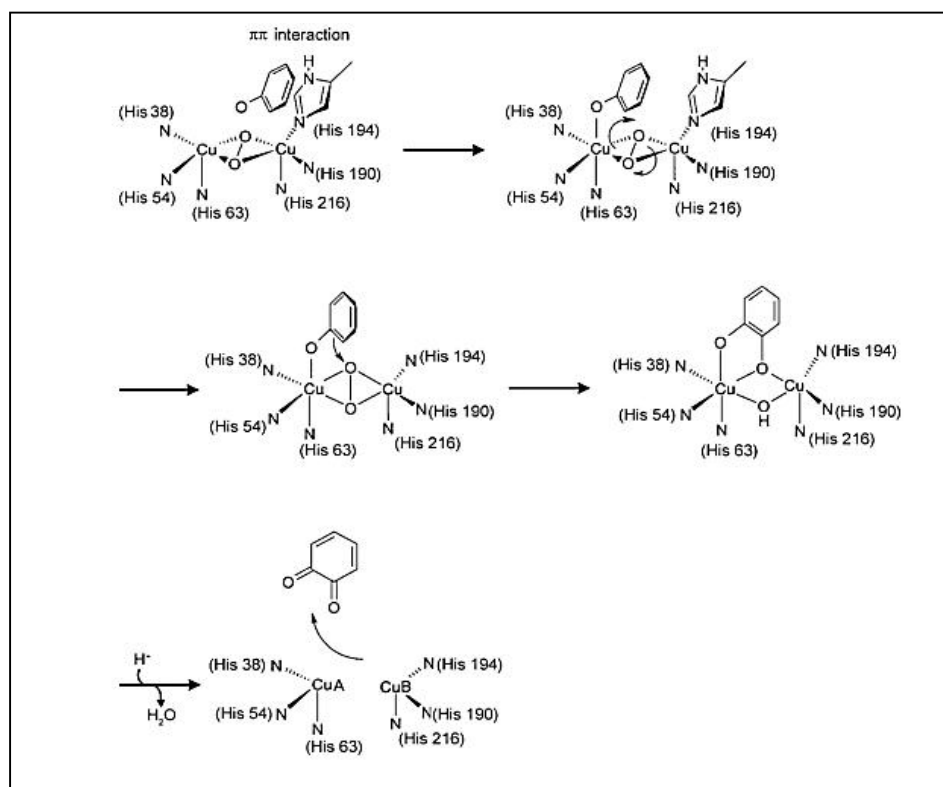
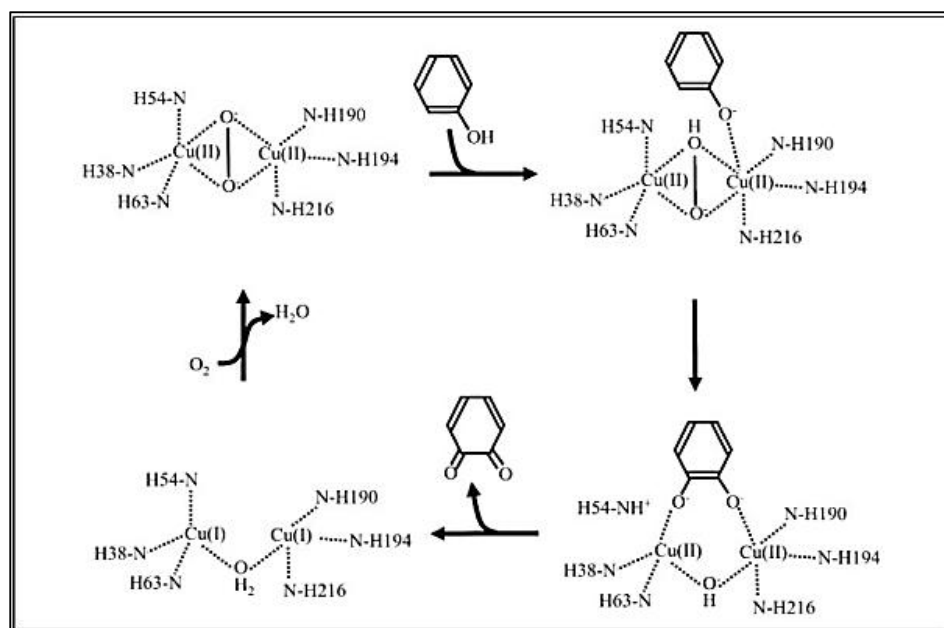
. μ μ μ

, μ «oxy»

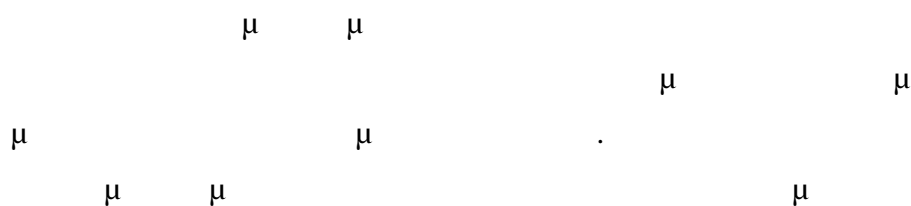
μ μ [Cu(II)-O₂-Cu(II)] (Rolff, M; Schottenheim, J; Decker, H; Tuczec, 2011).

μ μ μ μ
 μ - μ
 μ μ «met» μ
 μ μ Cu(II) μ μ
 μ μ oxy μ
 μ μ μ , μ
 μ μ - ,
 μ μ - μ
 μ μ μ
 μ - μ
 μ μ μ .
 μ μ met- μ , μ
deoxy- (Lee, Baek,
Lee, & Kim, 2016).

μ ,
 μ μ Matoba et al. (2006) Decker et al. (2006).
 μ μ μ , μ μ
 , :
 μ μ Cu(II) oxy μ
 μ μ
 μ μ μ Cu
 μ μ μ « »
 μ -
 μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ
 , μ
 ,
 μ deoxy (4.) (Matoba, Kumagai, Yamamoto, Yoshitsu, & Sugiyama, 2006) (Decker, Schweikardt, & Tuczek, 2006).
 μ μ μ
 μ μ Cu(A) ,
 μ Matoba et al.
 μ μ Cu(B) μ
 Decker et al. Cu(A)
 μ .

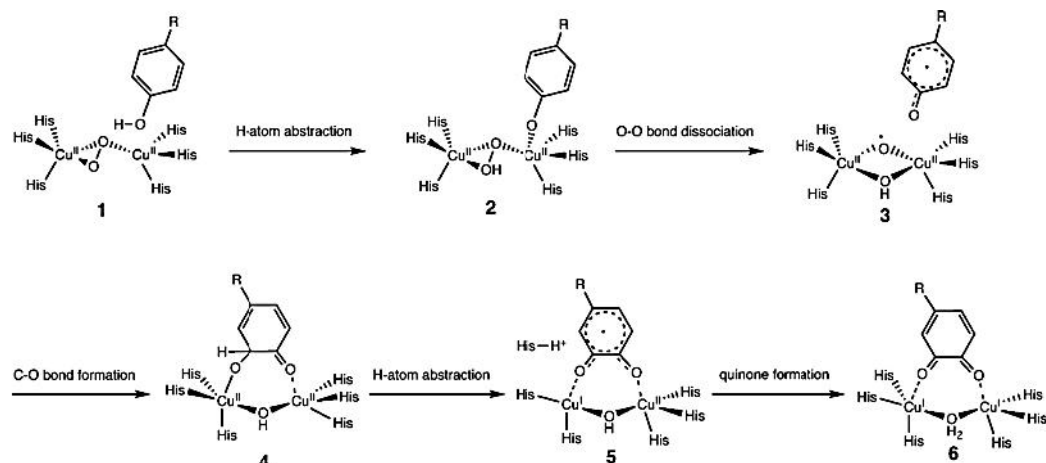


Εικόνα 4. Εικονική αναπαράσταση των σταδίων του καταλυτικού μηχανισμού της ScTYR σύμφωνα με τους Matoba et al. (2006) (πάνω) και τους Decker et al. (2006) (κάτω). Το υπόστρωμα δεσμεύεται στην οxy μορφή και απελευθερώνεται οδηγώντας έτσι στη deoxy μορφή



(Inoue, Shiota, & Yoshizawa, 2008).

Εικόνα 5. Εναλλακτικός μηχανισμός δράσης του ενζύμου τυροσινάση, με βάση το μηχανισμών ριζών (Inoue et al., 2008).



3.2.3. Χρησιμότητα ενζύμου

μ μ μ Parkinson.(Matoba et al., 2006)

(Goldfeder et al., 2013).

3.2.4. Εφαρμογές των τυροσινασών

A. Bisporus

μ μ , , LDL, μ μ , . A/PR8/ H1N1 (Bozzini et al., 2013). μ μ μ . μ Juan Carlos Espin et al. 2001 , μ - , μ . μ μ μ , μ μ (Espin, Soler-Rivas, Cantos, Tomas-Barberan, & Wichers, 2001). μ , , , - μ , μ μ . μ . μ μ μ , μ μ μ μ μ , μ μ μ (Yasuda, Takahashi, Ohe, Nakamura, & Mashino, 2013). μ μ μ . μ , μ μ μ L-DOPA. μ μ μ μ μ Parkinson. , μ dopa- , μ μ L-DOPA. μ , μ L-DOPA dopa- , μ L- (Fairhead & Th ny-Meyer, 2012).

μ μ ,
 μ .
 μ μ
 . μ *Rhizobium etli* μ
 μ μ μ ,
E. coli W3110 (Lagunas-Muñoz,
 Cabrera-Valladares, Bolívar, Gosset, & Martínez, 2006).

μ μ μ
 μ μ , . μ
 μ μ ,
 μ , μ μ μ , μ
 μ μ μ .
 μ ,
 μ , μ μ . . (Faccio et al.,
 2012). μ A.
bisporus *T. reesei*
 μ μ (Ercili-Cura, 2012).
 μ μ ,
 μ μ μ , μ
 μ .
 μ μ μ μ
 (Faccio et al., 2012)(Fairhead & Thony-Meyer,
 2012). μ
 μ .

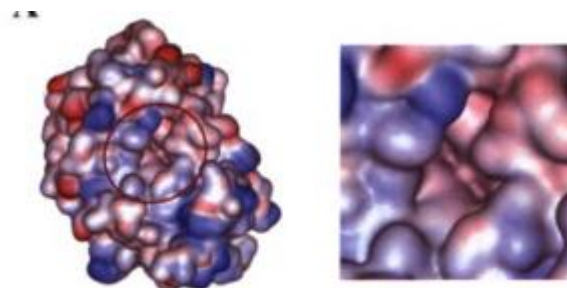
3.2.5. Κρυσταλλική δομή ενζύμου

μ μ
S. Castaneoglobisporus Matoba et al. (2006).
 μ μ ScTYR- μ μ
 μ , - μ μ μ
 ORF378 . μ μ
 Cu(II) . 2011

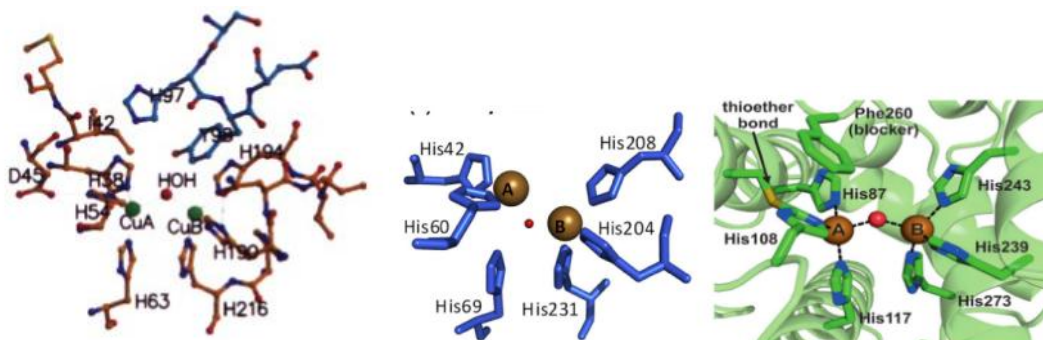
Sendovski et al. (2011).
μ μ
μ , μ μ .
μ .
μ μ
μ μ μ Cu(A)
μ His. BmTYR
μ μ Val,
μ (Kaintz et al., 2014). μ
« » μ μ ,
μ μ
μ .
μ μ , μ μ
BmTYR, Cu(A) μ μ
μ , μ Cu(B)
. μ μ μ
Cu(A) μ , μ
(Sendovski et al., 2011) Decker et al. (2006)
Olivares et al. (2009).
2015 μ μ
, *Juglans regia*,() Bijelic et al.
μ
μ μ μ . μ
μ μ μ
μ . μ
Cu(A) μ μ μ
μ S μ Cys, μ Cu(A) .
μ Phe μ
, μ
. μ

. (Bijelic et al.,

2015)



Εικόνα 6. Κρυσταλλική δομή της τυροσίνης ScTYR στην οποία σημαδεύεται η κοιλότητα που δεσμεύεται το υπόστρωμα. Το κόκκινο και μπλε χρώμα υποδεικνύει τα αρνητικά και θετικά ηλεκτροστατικά δυναμικά αντίστοιχα (Matoba 2006)



Εικόνα 7. (Αριστερά) Απεικόνιση του ενεργού κέντρου της ScTYR σε μετ κατάσταση (Matoba 2006) (Κέντρο Απεικόνιση του ενεργού κέντρου της BmTYR σε μετ κατάσταση (Sendovski 2011). (Δεξιά) Απεικόνιση του ενεργού κέντρου της JrTYR σε μετ κατάσταση(Bijelic, 2015). Στην απεικόνιση φαίνονται τα άτομα του χαλκού και οι ιστιδίνες με τις οποίες συγχρονίζονται

3.3. Κατεχολοξειδάση

3.3.1. Ενζυμική δράση

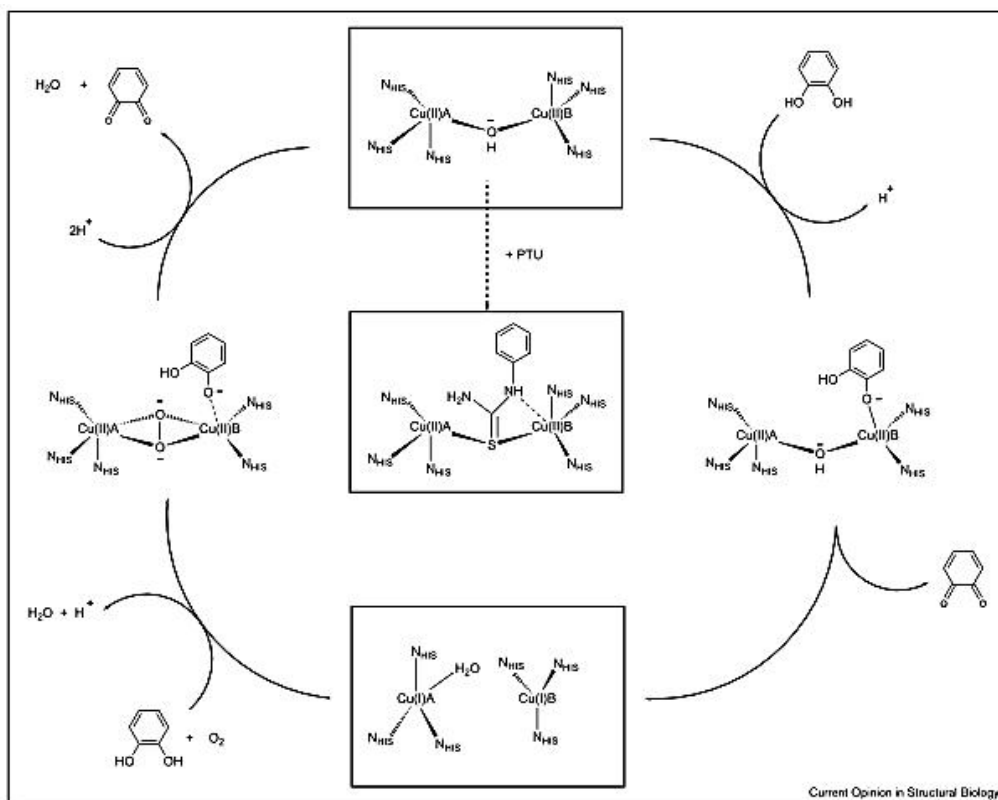
oryzae (Kaintz et al., 2014).

$$\mu \quad \mu \quad \mu \quad \mu \quad , \quad \mu$$
$$\mu \quad \mu \quad \mu .$$

μ μ μ —
 « » μ μ -
 μ μ , μ
 (Molitor, Mauracher, & Rompel, 2016).

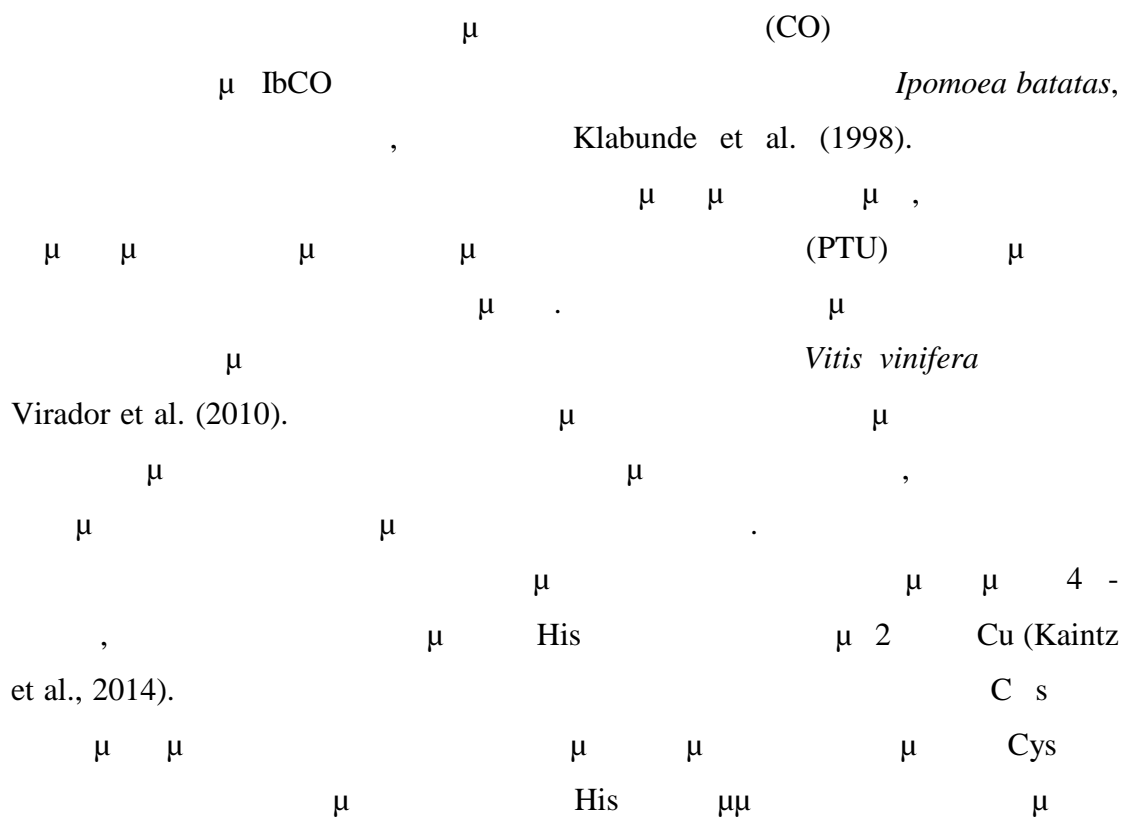
3.3.2. Καταλυτικός μηχανισμός

μ μ μ CO
 Klabunde et al. (1998) Wright et al. (2009).
 μ met .
 μ μ μ . μ
 μ oxy . μ μ
 μ μ
 Cu(B) (Klabunde, Eicken,
 Sacchettini, & Krebs, 1998). μ
 μ μ μ
 μ - μ μ H₂O μ
 μ - . μ OH⁻
 μ μ μ
 met μ (Wright &
 Dyson, 2009).
 μ μ COs
 μ
 μ H⁺ μ μ Cu
 (Siegbahn, 2004).



Εικόνα 8. Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός του ενζύμου κατεχολοξειδάση (Eicken, Krebs, & Sacchettini, 1999)

3.3.3. Κρυσταλλική δομή ενζύμου



Cu(A) (Virador et al., 2010).).

μ μ Phe

μ .

μ μ μ

μ , *Aspergillus oryzae*

Hakulinen et al. (2013). μ μ

AoCO μ

μ . μ AoCO μ

μ .

μ μ μ

μ μ COs

Cu μ μ 4 - .

μ μ μ His

4 - .

μ . μ AoCO

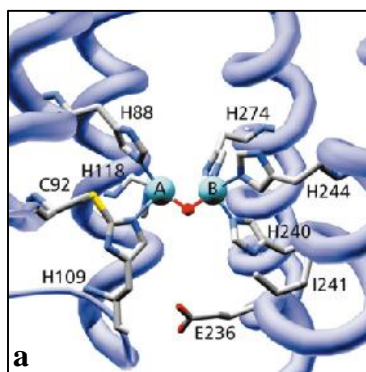
μ 2 - μ μ

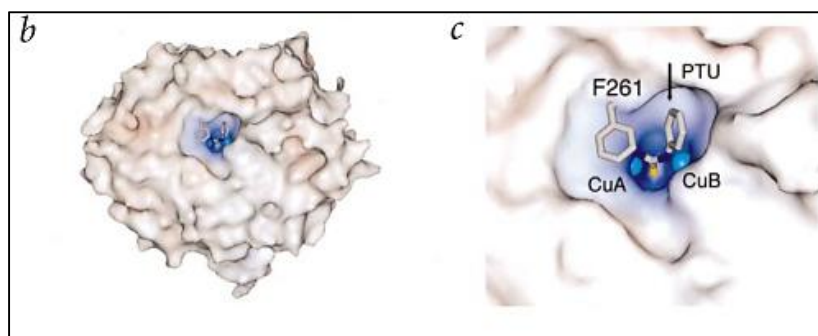
μ μ 3 μ

(Leu 180- Leu182) μ μ

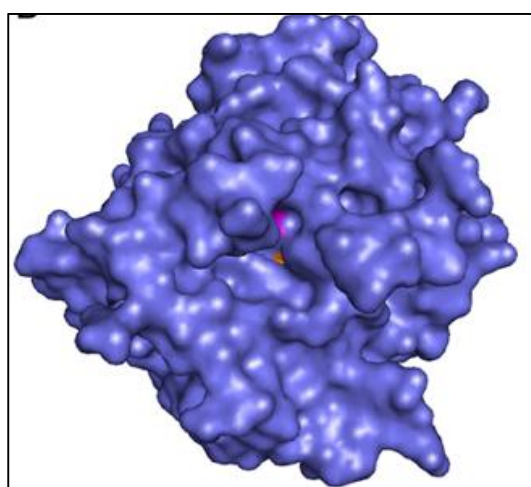
μ Phe

μ μ Cys- His (Hakulinen et al., 2013).



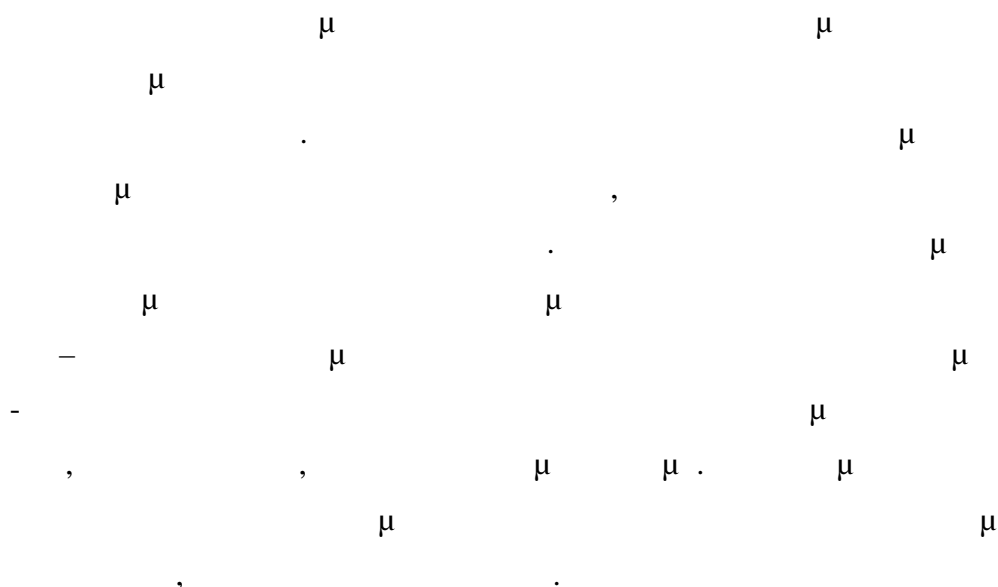


Εικόνα 9. (a) Το ενεργό κέντρο της IbCO της γλυκοπατάτας. Διακρίνονται τα ιόντα χαλκού και οι ιστιδίνες με τις οποίες συντονίζονται (Wright et al. 2009) (b & c) Το ενεργό κέντρο του κρυσταλλωμένου συμπλέγματος ενζύμου- PTU παρεμποδιστή, στο οποίο φαίνεται το «παρεμποδιστικό» αμινοξύ της Phe (Klabunde et al, 1998)



Εικόνα 10. Κρυσταλλικό μοντέλο της AoCO στο οποίο διακρίνεται η "σήραγγα" που οδηγεί στο ενεργό κέντρο (Hakulinen et al., 2013)

3.4. Εξειδικευμένη δράση μονοφαινολάσης/ διφαινολάσης-Ερμηνεία



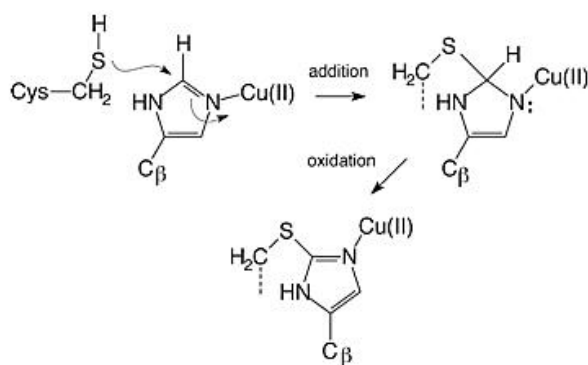
μ μ μ
μ COs μ , μ
.
μ COs IbCO VvCO μ
μ Phe μ
μ .
μ , ,
μ . μ μ
μ ,
μ . μ Phe Leu
μ μ .
μ Phe
, μ
Cu(A) μ
μ (. . Decker et al., 2006). Cu(B)
μ μ μ ,
μ .
μ μ Phe
μ ScTYR BmTYR.
ScTYR μ , BmTYR
μ Val μ
Phe (Sendovski et al., 2011). μ μ
AoCO μ
μ Phe. μ 2 - 3 μ Leu
μ μ Cu(A)
(Hakulinen et al., 2013). μ μ
μ μ μ
μ .
μ μ
μ met . ,
μ « μ », μ
μ μ oxy μ μ .

μ oxy ,
μ
(Olivares & Solano, 2009). « »

10-15% μ oxy, μ met μ .

(Hakulinen et al., 2013).

(Hakulinen et al., 2013).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του θειολεστερικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων Cys-His (Virador, 2010)

Bijelic et al. (2015)

.

,

,

.

μ
(6 Å μ) μ
.
μ
.
μ μ μ
μ
μ μ μ
μ μ μ
μ
μ μ μ μ .
μ ,
(Bijelic et al., 2015).

μ Solem et al. (2016)
μ μ Asn Glu
μ .
μ μ μ μ μ μ
μ Cu(A) Cu(B). μ μ ,
μ μ μ
μ μ μ . μ
μ
μ . μ
μ (Solem, Tuczec, & Decker, 2016).

« » μ , μ
μ ,
μ μ ,
μ , μ
μ , μ
μ
COs. μ « » μ
μ ,
μ
μ PPOs, μ μ μ

μ ,
 μ .
Cu μ
 μ
 μ ,
 μ ,
 μ .
 μ ,
PPOs
 μ
« »
PPOs
 μ ,
 μ ,
 μ .
 μ μ
 μ
 μ
 μ /
 μ (Molitor et al., 2016).

3.5. Κατευθυνόμενη εξέλιξη σε PPOs

3.5.1. Σημασία της εισαγωγής ή ενίσχυσης της δράσης μονοφαινολόασης των ΡΡΟs μέσω της κατευθυνόμενης εξέλιξης

[illegible]

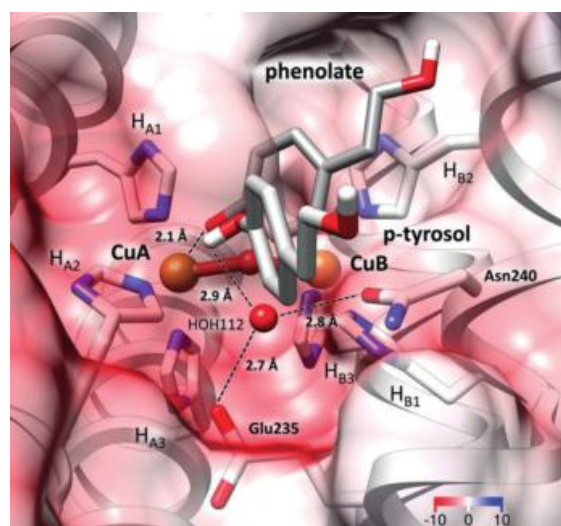
, μ μ
μ μ .

3.5.2. Γνωστές προσπάθειες εισαγωγής ή ενίσχυσης της δράσης μονοφαινολάσης ορισμένων PPOs μέχρι σήμερα

μ COs μ
μ μ μ 2010,
Shuster Ben-Yosef et al., μ μ
Bacillus megaterium. μ
μ R209H BmTYR 1,7
μ μ , μ μ 1,5
μ μ
μ His Cu(B),
μ μ (Shuster Ben-Yosef, Sendovski,
& Fishman, 2010).

Goldfeder et al. (2013)
μ BmTYR, μ
μ
μ V218-
μ μ Phe Gly (Goldfeder et al.,
2013).

Solem et al.
2016 μ
μ
VvCO μ μ
μ . μ
μ
μ G241 μ μ Asn
(μ G241N)



Εικόνα 12. Το ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης VvCO, παρουσία του υποστρώματος p- tyrosol. Διακρίνονται τα αμινοξέα Glu και Asp, το μόριο νερού και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Solem et al., 2016)

241
His Cu(B)
μ μ
μ
μ μ /
Asn μ μ μ Glu
μ (Solem et al.,
2016). μ μ μ μ

3.6. Υποστρώματα- Ονοματολογία

μ
μ , μ
μ μ ,
μ .

3.6.1. Μονοφαινόλες

μ
μ
.
,
.
μ μ
μ μ (Weng
& Yen, 2012). μ «μ » μ
μ , μ
μ -OH . μ
PPOs μ μ
μ -OH
μ «μ -»
(Quideau, Deffieux,
Douat-Casassus, & Pouységu, 2011). μ μ
μ μ ,
«μ » μ μ
μ μ μ μ . μ
μ .

3.6.2. Όρθο- διφαινόλες

(Allouche, Damak, Ellouz, & Sayadi, 2004).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- : μ μ
- Labo Autoclave, SANYO (. . .)
- pH- μ 537, WTW (μ)
- Orbit LS, Labnet (.)
- μ μ μ Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (μ)
- μ μ
- μ ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd ()
- μ UV2000, Hitachi (. . .)
- μ Direct-Q, Millipore (. . .)
- μ TC-512, TECHNE (. . .)
- Easygel H1-set, Scie-plas (.)
- Micropulser™, Biorad (. . .)
- μ Mini-PROTEAN 3, Biorad (. . .)
- E863, CONSORT ()
- μ InGenius BioImaging, Syngene (.), μ μ GeneSnap v6.05 GeneTools v3.06
-
- Amicon Stirred Cell 8400 μ μ μ PM-10, Millipore (. . .)
- J2-21 TJ-6 Beckman Coulter (. . .), Sorval® RC28S, DuPont (. . .) μ Eppendorf 3200 (μ)
- (Biorad, . . .) μ Talon® μ (Clontech, . . .)
- μ μ μ μ
- Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) Abs 120-4 (KERN & Sohn GmbH)

- μ microplate Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- SPECTROstar Nano Microplate Reader (BMG Labtech)

μ
: , μ , ,
, eppendorf tubes, paster, μ .

2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

μ μ μ μ
:

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene,): μ

DNA μ μ
 μ pPICZ (Invitrogen).
 μ .

endA,

μ DNA μ . :
endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'::Tn10
proAB⁺ lacI^q (lacZ)M15 Amy Cm^R] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen,): μ

DNA μ μ
 μ pCR[®] Blunt (Invitrogen).
 μ .

μ . :

F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 nupG recA1 araD139
(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 -

Pichia pastoris -33 (Invitrogen): μ μ *Pichia*

pastoris (Mut⁺) μ
 μ μ pPICZ A.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1. Εμπορικά Ένζυμα και αντιδραστήρια

μ μ μ μ
μ :

- Pfu Turbo HotStart Polymerase (2,5 U/μL) (Agilent Technologies)
- KOD Hot Start Polymerase (1,0 U/μL) (Novagen)
- *EcoRI* (15 U/μL) (Takara Bio Inc.)
- *XbaI* (15 U/μL) (Takara Bio Inc.)
- μ *DpnI* (10 U/μL) (Takara Bio Inc.)
- μ *EndoH* (500 U/μL) (BioLabs Inc.)
- μ ExpressLink™ T4 DNA Ligase[†] (5 U/μL) (Invitrogen)

μ DNA μ
E. coli μ GenElute™ Plasmid Miniprep
Kit (Sigma- Aldrich). μ DNA μ
μ μ NucleoSpin® Gel and
PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

3.2. Αντιβιοτικά

μ
DNA μ , :

Πίνακας 1. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και συγκέντρωση αυτών

μ		(μg/mL)
<i>E. coli</i> TOP 10	μ	50
<i>E. coli</i> XL1- Blue		25
<i>P.pastoris</i>		100

3.3. Θρεπτικά υλικά

E. coli XL1-Blue

LS-LB (Low Salt-LB)

μ (. 1.). μ μ

, μ

« » .

:

Πίνακας 2. Σύσταση θρεπτικού υλικού LB

	% w/v	μ	H ₂ O
	1		
NaCl* ¹	1		
μ μ (Yeast extract)	0,5		
* ²	1,5		

*¹ LS-LB 0,5% w/v NaCl, μ .

*² .

E. coli TOP10 μ

LB μ (. 1.).

μ *P. pastoris* μ

: YPD, BMGY, BMMY .

(. 1.).

, μ μ

, :

Πίνακας 3.. Σύσταση θρεπτικού YPD για ανάπτυξη της ζύμης *P. pastoris*

YPD	
	% w/v μ H ₂ O
	2
	2
μ μ	1
*	2

*

Πίνακας 4. Σύσταση διαλύματος YNB, απαραίτητου συστατικού των BMGY, BMMY

	% w/v μ H ₂ O
Ammonium Sulfate	10
Yeast Nitrogen Base	3,4

Πίνακας 5. Σύσταση θρεπτικών υλικών BMGY, BMMY, MM για ανάπτυξη της ζύμης *P. pastoris* (b)

	% w/v μ H ₂ O
	1,5
	% v/v
	10
μ	0,5
	0,4 mg/L
BMGY	
	% w/v μ H ₂ O
	2
μ μ	1
	% v/v
	10
μ μ 1M Potassium Phosphate pH=6	10
X10 μ *	10
	0,4 mg/L
CuSO ₄	25 μ

* BMMY BMGY, μ
0,5% v/v μ , μ μ μ

3.4. Ρυθμιστικά διαλύματα (buffer)

μ
μ μ μ :

Πίνακας 6. Σύσταση και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

μ μ	pH		()
Sodium Phosphate	6-8	Na ₂ HPO ₄	0,1
		NaH ₂ PO ₄	0,1
Potassium Phosphate	6	K ₂ HPO ₄	1
		KH ₂ PO ₄	1
Na ₂ HPO ₄ / Citric acid	3-6	Na ₂ HPO ₄	0,2
		Citric acid	0,1
Tris/ HCl	8-9	Tris base	0,1
		HCl	
Talon	8	Tris base	0,5
		NaCl	3
Tris/ 0.2% w/v SDS	8,8	Tris base	0,75
		SDS 0,2% w/v	
Tris/ 0.2% w/v SDS	6,8	Tris base	0,25
		SDS 0,2% w/v	

3.5. Εκκινητές

μ MtOx60685
μ μ μ μ ,
· μ μ μ
μ μ DNA ·
(primers) μ μ μ
MtOx , ,
Eurofins MWG Operon.

μ (μ «forward» F «reverse» R) μ μ μ . 7 μ , μ μ .

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

	μ μ μ	μ Primer		m (°C)
G292N (/ :1)	MutOx1	MutOx_G292N_ F	5'GAGATCGGCCCCCACAACG GCATCCACTACAC3'	80,2
L306A (/ :2)	MutOx2	MutOx_L306A_F	5'CGGGCGGCGACGCATTCACC TCCCCCGG 3'	78,8
Y296V (/ :3)	MutOx3	MutOx_Y296V_ F	5'CGGCATCCACGTAACCATCG GCGGCGACCC 3'	77,7
MutOx 187- S199 (/ :4)	MutOx4	MutOx_4_F	5' <u>CGCCGGCCGGGAGCA</u> GATGACGGGCCCCGTCGTGG 3'	64
		MutOx_4_R	5'CGGCTGCGGCCCGGCCCTCG CT 3'	64
		MtOx_60685_F	5'GCGAATCCGCTGTTCTTCC GATGCGCC 3'	58
		MtOx_60685_R	5'CCGCTCGACACGA TGAAAATAGATCTCG 3'	55

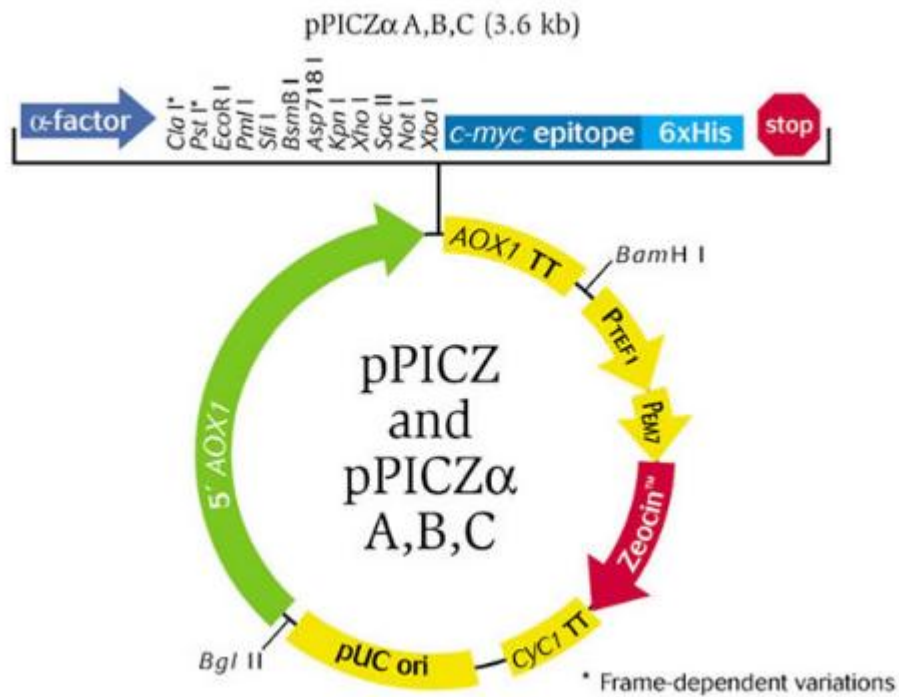
μμ μ μ μ (overhanging).

3.6. Πλασμιδιακοί φορείς

3.6.1. *pPICZαA*

μ μ μ μ pPICZ A
Invitrogen. μ μ ,
μ μ *P. pastoris*.
μ μ μ . -
AOX1

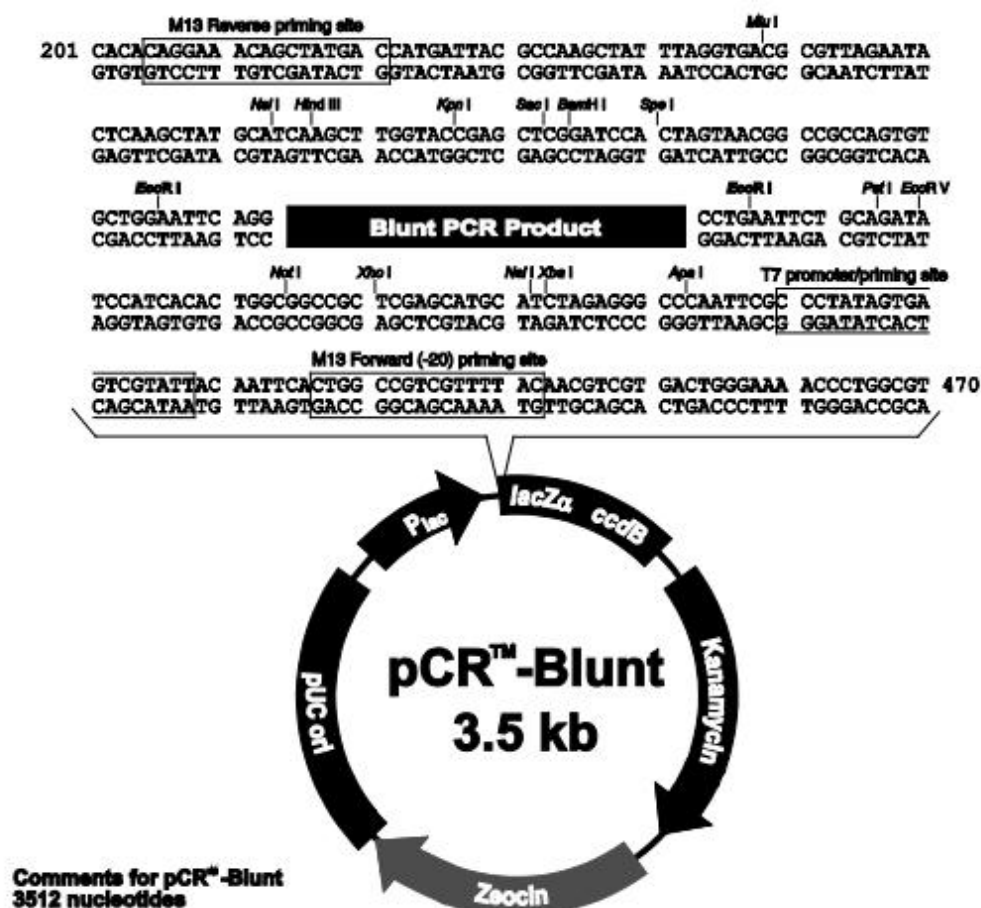
factor C- 6
μ His μ .



Εικόνα 13. Πλασμιδιακός φορέας pPICZαA (ThermoFisher cite)

3.6.2. pCR® Blunt

μ MutOx
I178-S199 μ μ pCR® Blunt
Invitrogen. μ μ DNA μ
μ ccdB E.
coli. μ μ DNA
ccdB. μ μ μ E.coli
μ pCR® Blunt μ ,
μ .
μ .



Εικόνα 14. Πλασμιδιακός φορέας pCR^R Blunt (ThermoFischer cite)

4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ DNA

μ μ μ μ
 μ $MtOx60685$ μ μ
Myceliophthora thermophila. μ μ DNA μ
 1275 bp μ 424 μ . ,
 , μ μ MtOx
 μ , μ
 μ . μ
 μ - (signal peptide)
 μ μ .
 μ μ μ
 , μ .
 μ 46,5 kDa 3 -

7-8

-

.

(signal peptide) :

EFRCSSDAPPPAPVGDDLTEPKELTDLFEKAKKAVIDRLHEDEKALRARGEAP
RCTADKLIFRREYGSLSKDERLAYVNAVVKCLQSKPPRTPASVAPGARSRFDDF
VVVHIQQTLDIHYSGIFQAWHRWFVYQYEKALRDECGYTGYQPYWDWPKY
ASAPQDSPLFNGDPYSLGGNGEYVPHDGPVIVPPEGVSGGNISLPAGVGGGFV
RTGPFANMTVNLGPVGGLADTAPGPQGGLGYNPRGLKRD LGGAMNTRYAN
YTTVLRLLTQPDVDAFRTVSEGVPYTVEIGPHGGIHYTIGGDPGGDLFTSPGD
PAFWVHHAQMDRVWATWQALGLLPPADGGDPDPARRYTDLGKGDYAHRT
WQNSPPSPFAELSDVIDMGYAAPSTTIGAVMSTTEGELCYFYL

5. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών

μ

μ

μ

μ

μ

T= 121°C

μ 20 min.

,

μ 40 C

.

LB

LS-LB

μ

pH μ

μ 7,0- 7,4 μ

μ NaOH 1M.

,

μ

μ

.

BMGY

BMMY

μ

.

μ

,

μ

T= 4°C,

μ

μ

.

,

μ

T=40°C

.

BMMY

μ

μ

μ

μ

μ

μ

μ

20-26 h.

5.2. Μοριακές τεχνικές

5.2.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για μεταλλαξιγένεση

μ μ μ
μ (Polymerase Chain Reaction- PCR).
μ in vitro μ μ
μ μ DNA. μ μ
DNA ,
μ . μ μ
μ μ μ μ
(primers) μ μ PCR.
μ μ μ
(Alberts et al., 2011).
DNA, μ μ
μ DNA. μ
μ μ μ μ
PCR. μ
 ,
μ . ,
μ μ DNA, μ
μ μ μ , PCR
μ μ μ DNA.
μ μ
μ μ
μ PCR .
μ μ PCR. μ
μ μ μ μ
μ ,
μ .

Πίνακας 8. Συνθήκες εφαρμοσμένης μεθόδου PCR για την παραγωγή των αντιγράφων μεταλλαγμένου πλασμιδίου pPICZaA

	(°C)	t(s)
	95	120
	95	30
	9	30
μ	72	9
μ μ	72	600
μ μ μ	4	-
μ μ PCR		
μ	18	

Πίνακας 9. Μεταβαλλόμενες συνθήκες της PCR μεταλλαξιγένεσης

/		μ (°C)	μ (s)
1	G292N	53	300
2	L306A	53	360
3	Y296V	55	360
4	1- 187	52	50
	S199-L424	60	50
	MutOx I187-S199	61	80

μ μ μ (/ :1,2 3)
μ μ PCR :

Πίνακας 10. Σύσταση μίγματος που εισήχθη στη συσκευή PCR για μεταλλαξιγένεση (Μεταλλάξεις με A/A: 1, 2 και 3)

	(μL)
H ₂ O	32
μ μ μ (μ MgSO ₄)	5
dNTPs (2 mM)	5
μ DNA x10 μ (pPICZaA)*	5
μ «forward» (50 μ)	1
μ «reverse» (50 μM)	1
μ μ Pfu Turbo HotStart	1

* MtOx

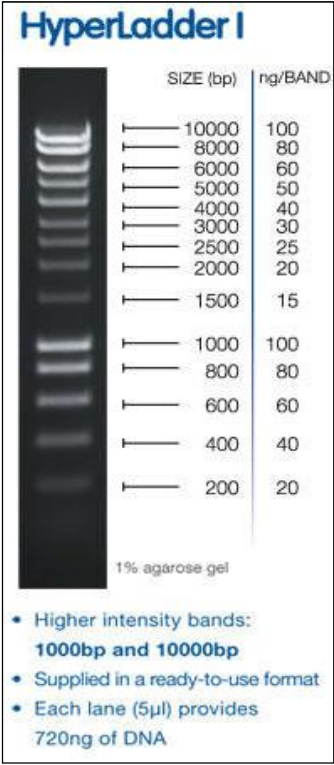
μ MutOx I187-S199 μ μ
μ μ 33 , μ
μ 188, μ 198.
μ μ ,
μ , μ μ μ
μ . μ
μ μ DNA
(μ μ
μ). μ μ
PCR, μ μ μ μ
DNA μ μ μ μ
μ . μ
μ μ , μ μ μ
μ μ μ . μ μ μ μ
μ μ μ PCR.
μ μ , 33
μ μ PCR
μ μ DNA
μ μ MutOx I187-S199 :

Πίνακας 11.Σύσταση μίγματος που εισήχθη στη συσκευή PCR για πολλαπλασιασμό των δύο αλληλουχιών M1-L165 και G176-L424

	(μL)
H ₂ O	29
μ μ μ 10	5
dNTPs (2 mM)	5
MgSO ₄	3
μ DNA x10 μ (pPICZaA)*	5
μ «forward» (50 μ)	1
μ «reverse» (50 μM)	1
μ μ OD Hot Start	1

μ μ PCR
μμ :

μ, μ UV μ e
μ InGenius BioImaging, Syngene.



Εικόνα 16.. Απεικόνιση του αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης του πρότυπου Hyperladder I (Centaaur cite)

Πίνακας 13. Συνήθης σύσταση δείγματος προς ηλεκτροφόρηση*

	(μL)
μ PCR	5
Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline)	2
ddH ₂ O	3

Πίνακας 14.Σύσταση διαλύματος TBE(10x)

Tris Base	108 g/L
	55 g/L
EDTA 0,5 M pH=8	40 mL/L

* μ DNA
μ, μ
μ μ 5 μL Crystal 5x DNA
Loading Buffer Blue (Bioline).

5.2.3. Καταστροφή του «γονικού» (parental) DNA

DNA μ
PCR μ μ μ DpnI
(Agilent Technologies). μ μ
μ μ DNA. μ DNA
μ μ *in vivo* μ μ
μ μ DNA *in vitro* μ μ
PCR μ μ DpnI. 1

μL μ μ μ PCR.
μ 1 h μ T= 37 C.

5.2.4. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με θερμικό σοκ

μ μ μ μ μ
μ DNA μ μ *E. coli*
μ DNA.
μ T= -80°C μ
100 μL μ 51% v/v μ CaCl 0,1 M 49% v/v
μ 50% v/v, eppendorf.
μ μ μ μ μ *E. coli* μ μ T=4 C
μ . μ 5 μL μ PCR
μ μ μ μ DNA,
μ *DpnI*. μ μ DNA μ
T= 4°C 30 min. T=
42°C 70 s (Heat Shock). μ μ μ
LB 200 μL 1 h = 37 C.
μ
(LS-LB Zeocin XL1-Blue
LB Kanamycin TOP10). T=37°C 20 h.

5.2.5. Κλωνοποίηση και παραλαβή του πλασμιδιακού DNA

μ μ μ
, μ μ ,
μ 5 mL.
(190 rpm) μ T=37°C 16-20 h (overnight).
μ μ DNA
μ GenElute™
Plasmid Miniprep Kit (Sigma- Aldrich).

5.2.6. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

μ DNA μ μ μ
. μ 13 14

μ . μ μ μ
μ *EcoRI* *XbaI*, μ 1 h
μ T=37°C. μ μ μ
μ DNA :

Πίνακας 15. Σύσταση μίγματος πέψης πλασμιδιακού DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *XbaI* & *EcoRI*

	(μL)
μ DNA	5
μ μ <i>XbaI</i> 10X (10 mM Tris-HCl, pH=7,5, 7mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 7 mM 2-mercaptoehtanol, 0,01% BSA)	2
<i>EcoRI</i>	1
<i>XbaI</i>	1
H ₂ O	11

μ μ μ DNA μ μ
μ , μ μ μ , μ
μ (5.2.2). μ
μ μ μ μ 5 μL
Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline).

5.2.7. Αλληλούχιση DNA (DNA Sequencing)

μ μ μ
DNA μ μ μ PCR,
μμ μ .
μ μ DNA .
μ μ μ DNA 10
μL (300-500 ng), VBC-Biotech Services GmbH ().

5.2.8. Ανασυνδυασμός του πλασμιδιακού φορέα *pCR® Blunt* με γραμμικό DNA

μ μ
μ μ μ DNA μ μ

ExpressLink™ T4 DNA Ligase† (Invitrogen).
μ Eppendorf μ 2 h
μ T=16°C. μ μ :

Πίνακας 16. Σύσταση μίγματος για ανασυνδυασμό του πλασμιδιακού φορέα pCR® Blunt με το επιθυμητό γραμμικό τμήμα DNA

	(μL)
μ μ μ pCR® Blunt	1
μμ μ μ DNA μ	5
μ μ 5X T4 DNA	2
H ₂ O	1
μ ExpressLink™ T4 DNA Ligase†	1

5.2.9. Προετοιμασία και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

μ DNA
μ μ , *P. pastoris*
μ
μ μ μ DNA, μ μ μ
E. coli μ μ 5.2.4, 5.2.5.
μ μ
μ μ μ μ , μ μ
:

5.2.9.1. Προετοιμασία επιδεκτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων ζύμης *P. pastoris*

P. pastoris -33 μ
50 mL YPD
μ T=30°C (180 rpm) 1 d.
5 mL μ
YPD 100 mL,
O.D₆₀₀= 0,56. 100 mL

μ
 $O.D_{600} = 1,3 - 1,6$ (μ 4 h).
 μ
 TJ-6 Beckman Coulter $T=4^{\circ}C$
 8000 rpm 6 , μ :
 I. 10 min μ
 II. (10 min μ H_2O) 3
 III. (8 min μ μ 1) 2
 μ μ
 μ μ . μ
 μ μ
 $T=4^{\circ}C$. μ
 600 μL μ 1M
 $T=4^{\circ}C$.

5.2.9.2. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση

80 μL μ
 5.2.9.1. 30 μL
 $\mu\mu$ μ μ DNA (μ
 5.2.6.). 110 μL μ
 μ μ
 ($T=4^{\circ}C$) 5 min.
 μ $\mu\mu$ Pic (μ
 2 kV 4 ms). μ
 μ μ μ $\mu\mu$
 μ DNA. μ
 μ μ μ $\mu\mu$ μ 1
 mL μ μ 1M. μ
 μ μ falcon tube 15 mL μ
 μ 2 h μ $T=30^{\circ}C$. μ

μg/mL). μ YPDS-μ (100
μ T=30°C 3 d.

5.3. Τεχνικές παραγωγής και παραλαβής πρωτεΐνης

5.3.1. Επιλογή κλώνου μετασχηματισμένης ζύμης με βάση τα επίπεδα παραγωγής πρωτεΐνης (plate assay)

3 d

μ μ μ DNA.

μ μ DNA

μ μ .

μ μ .

μ μ .

μ ,

μ μ μ

μ (-factor pPICZ A),

μ

(AOX1).

μ μ

μ μ

μ μ (plate assay). μ μ

μ .

μ , μ μ ,

μ T=30°C 3 d.

5 mL μ

4- 10 mM

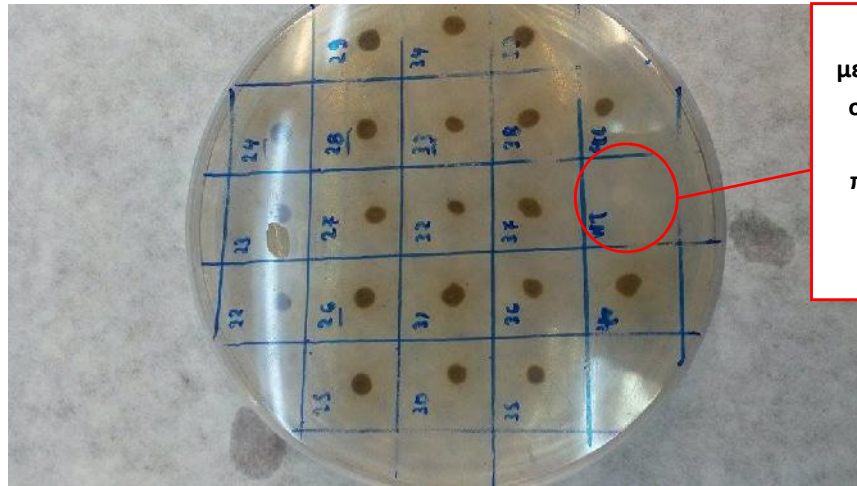
μ μ (30-60 min) μ

T=60°C. μ μ μ μ 4-

μ (). μ μ

=60°C , μ ,

μ μ μ .



Το αρχικό μη μετασχηματισμένο στέλεχος X-33 δε φαίνεται να παράγει ένζυμο, όπως ήταν αναμενόμενο.

Εικόνα 17. Plate assay για προσδιορισμό του κλώνου μετασχηματισμένης ζύμης *P. pastoris* που φέρει τη μετάλλαξη G292N που παρουσιάζει μεγαλύτερη παραγωγικότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (καφέ κλώνοι: κλώνοι που παράγουν το ένζυμο και οξειδώνουν το υπόστρωμα χλωροκατεχόλη, υποκίτρινοι κλώνοι: δεν παράγουν το ένζυμο)

5.3.2. Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε καλλιέργειες κυττάρων ζύμης εργαστηριακής κλίμακας.

5.3.2.1. Υγρές καλλιέργειες εργαστηριακής κλίμακας του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένης ζύμης *P. pastoris*

μ
 100 mL
 T=30°C
 (180 rpm).
 500 mL
 50 mL
 2 L.
 20 mL
 T=23°C,
 4 d.
 (0,5% v/v) μ

μ μ

5.3.2.2. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου της καλλιέργειας με φωτομέτρηση

μ μ , μ , μ μ
 , μ μ
 200 μL. μ 20 50 μ μ
 1 mL, O.D₆₀₀ μ μ
 μ . μ O.D₆₀₀ μ μ μ
 UV2000, Hitachi μ μ μ μ μ ,
 μ μ . μ
 O.D₆₀₀ μ μ
 μ , μ μ μ
 (calibration). μ μ μ μ
 μ

5.3.2.3. Παραλαβή του εξωκυτταρικού υγρού μίγματος καλλιέργειας (crude)

10

min μ 10000 rpm. μ ,
 , μ
 μ . μ μ ,
 μ μ μ μ 0,8 μm,
 μ μ μ 0,2 μm.
 ,
 T=4°C μ μ .

5.3.2.4. Συμπύκνωση του crude με υπερδιήθηση

« »

μ Amicon Stirred Cell 8400 μ
 μ μ PM-10, Millipore (. . .) μ μ

μ 10 kDa. μ 10 μ μ
μ 50 mL.

5.3.2.5. Εξισορρόπηση του crude σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon pH= 8

μ μ .
«crude» μ μ μ μ
μ . (dialysis).

5.3.2.5.1. Εξισορρόπηση του crude με υπερδιήθηση

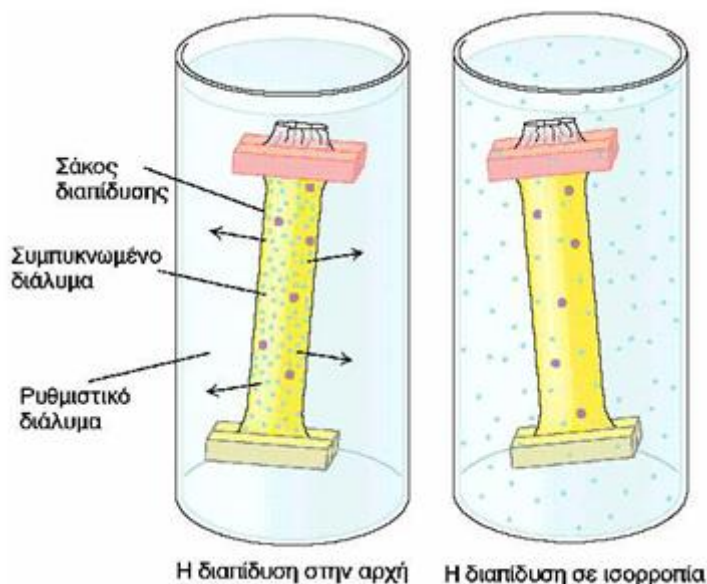
μ μ
μ (crude) 100 μ
μ μ Talon.
μ μ Amicon Stirred Cell
8400 μ μ μ PM-10, Millipore (. . .) μ
μ μ crude .
μ μ μ μ μ
falcon tube 50 mL μ
T=4°C.

5.3.2.5.2. Εξισορρόπηση του crude με διαπίδυση (dialysis)

μ μ μ
μ μ μ μ μ μ .
μ μ μ
μ μ μ μ μ , μ
μ μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ μ
(Dialysis tubing cellulose membrane, flat width 25 mm, 12000 Da, Sigma-Aldrich) μ 30 min μ
μ 100 C. μ μ μ
5 L Talon (μ μ

[illegible]

Εικόνα 18. Απεικόνιση της διαδικασίας της διαπίδυσης σε εργαστηριακή κλίμακα



5.3.2.6. Καθαρισμός και παραλαβή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

μ

pPICZaA C-

His.

His

μ

μ , Co²⁺.

μ

μ , μ

μ μ ,

μ μ μ

μ μ . μ μ

His

, μ μ .

(Biorad, . . . -

2.12) μ 3 mL Talon® Metal

Affinity Resin (Clontech, . . .)		T=4°C		μ
20% v/v ethanol.		μ	:	
I.	μ	μ		
II.		μ 20 mL	μ	H ₂ O
III.		μ	μ	60 mL
	μ	μ Talon (3	μ 20 mL	μ
	μ)		
IV.		μ	μ crude	μ
V.		μ 10 mL	μ	μ Talon
VI.		μ 5 mL	μ	μ 5 mM
VII.		μ 7 mL	μ	μ 100 mM
	μ			
VIII.		μ 7 mL	μ	μ 100 mM
	μ	μ		
IX.		μ 80 mL	μ	μ H ₂ O
	(4	μ 20 mL)	
X.		T=4°C,		4
	mL	μ 20% v/v ethanol	.	
	μ	μ	IV, V, VI, VII	VIII
	falcon tubes		,	
	T=4°C.	μ		μ ,
			5.3.3.4.	
	μ	μ	μ	,
	μ μ μ	.	μ	μ
	μ	μ	μ μ	100 mM.

5.3.2.7. Εξισορρόπηση του διαλύματος της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα Sodium Phosphate pH=7 0,1M

μ μ μ ,
 , μ μ Sodium Phosphate pH=7 0,1
 μ (

μ pH-optimum). μ μ

5.3.2.5.2.

μ μ μ T=4°C.

5.3.3. Μέθοδοι ανάλυσης της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης

5.3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο λαμβανόμενο πρωτεϊνικό διάλυμα

μ μ μ μ μ μ
μ μ μ μ 280 nm, μ μ 10 μg/mL.
μ μ μ
, μ μ 280 nm,
μ μ .

H $O.D_{280}$ μ μ UV2000, Hitachi
μ μ μ (Stoscheck, 1990):

$$C(\text{ }) = (O.D_{280}) / C(\text{mg/mL}) = C(\text{ }) / MW (\text{ })$$

:

C(), Molarity

C(mg/mL), mg/mL

$O.D_{280}$, μ μ 280 nm

MW, μ

, μ μ
μμ ProtParam μ ExPASy.

5.3.3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

μ μ μ SDS-PAGE μ
μ μ μ . μ μ

μ
μμ
(SDS)
-μ
μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ
μ μ μ μ μ

5.3.3.2.1. Προετοιμασία της πηκτής SDS-PAGE

μ μ
μ μ μ μ μ
μ 17. μ μ μ
SDS-PAGE Mini-Protean 3
(Biorad),
μ μ μ,
μ « » μ μ
μ
μ μ
500 mL μ
μ 30,3 g/L Tris, 144 g/L , 1% w/v SDS, pH 8,3.

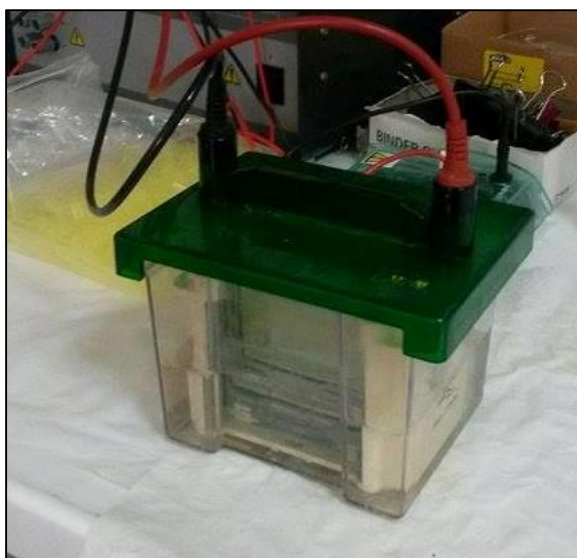
Πίνακας 17.Σύσταση των δύο φιλμ της πηκτής πολυακρυλαμίδιου για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-PAGE

μ			
	(μL)		(μL)
ddH ₂ O	3500	ddH ₂ O	3000
μ μ 0,75 Tris, 0.2% w/v SDS, pH 8,8	9400	μ μ 0,25 Tris, 0.2% w/v SDS, pH 6,8	3750
40% bis-acrylamide	5800	40% bis-acrylamide	750
TEMED	30	TEMED	20
10% w/v APS	90	10% w/v APS	60

5.3.3.2.2. Προετοιμασία του πρωτεϊνικού δείγματος και φόρτωση στο πήκτωμα

reaction Buffer 10X (BioLabs Inc.) 2 µL µ (x100 µ).
 µ 1 h T=37°C.
 µ µ µ :
 µ µ (20µL) 5 µL µ (1
 g SDS, 5 ml 0,25 M Tris pH 6,8, 2,5 ml 50% w/w , 2,5 mL
 µ , 4 mL 0,1% w/v µ)
 µ 5 min. µ µ SDS-PAGE.
 7 µL µ µ
 (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe GmbH)
 µ µ µ . µ
 µ µ 35 mA/ µ 90 min.

Εικόνα 19. Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών



5.3.3.2.3. Χρώση της πηκτής SDS-PAGE και εμφάνιση της θέσης των πρωτεϊνικών μορίων

μ
 μ 40%
 v/v μ, 10% v/v CH₃COOH, 0.4% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250
 μ 20 min, . μ μ
 μ μ μ μ μ μ (destaining
 solution) 40% v/v μ, 10% v/v CH₃COOH.
 μ, μ μ μ μ.

5.3.3.2.4. Προσδιορισμός ενεργότητας της ζώνης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης

5.3.3.2.2.,
(50% v/v , 0,1% v/v BPB Dye). 20 µL 5 µL 5 native µ µ 25 µL µ , µ , . µ µ 7 µL (Pink Prestained Protein Marker Nippon Genetics Europe GmbH). µ µ . µ µ µ . µ 5.3.3.2.3., 2,5 mM. µ µ T=40 C µ (µ), µ µ .

μ ,
 , μ μ μ .
5.3.3.3. Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αρχικής πρωτεΐνης και των μεταλλάξεων αυτής
 MtOx μ ,
 μ .
 Hhpred μ
 , μ μ μ μ μ . ,
 μ μμ Coot μ μ
 μ MtOx.
 μ μ μ
 μ (μ .pdb) μ μ .
 μ μμ Chimera
 1.11 μ .

5.3.3.4. Προσδιορισμός του φάσματος απορρόφησης του ενζύμου


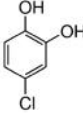
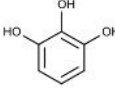
μ μ μ
 220nm-700nm μ SPECTROstar
 Nano Microplate Reader (BMG Labtech). μ ,
 μ ,
 , μ μ μ μ
 μ μ 2 nm. μ μ μ
 μ μ μ μμ SigmaPlot 12.

5.3.3.5. Εξέταση της εξειδικευμένης δράσης του μεταλλαγμένου ενζύμου σε διάφορα υποστρώματα (substrate specificity)


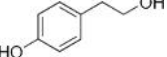
μ μ μ μ
 μ μ μ
 μ . μ , 2mM,
 μ
 μ Sodium Phosphate. μ
 μ T=40°C, (900rpm), μ 21 h

(μ) 500 μ L
 μ 1,84 mM. μ
 μ μ μ μ
 μ μ .
 μ
 μ μ μ μ
(Fronk et al., 2015). , ,
 μ 220-700 nm.
 μ μ μ
 μ μ . μ
 μ μ
 μ μ -
 μ (blank)- μ
 μ μ .
 μ μ μ , μ
 . μ μ , μ pH
18-24:

Πίνακας 18. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (κατεχολικά, μονοϋποκατεστημένα)

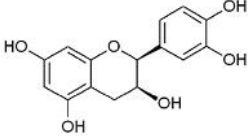
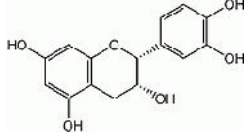
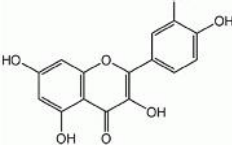
μ	pH	μ
	6	
	7	
	6	

Πίνακας 19.Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (μονοφαινολικά, μονοϋποκατεστημένα)

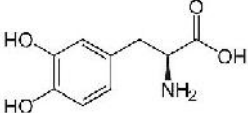
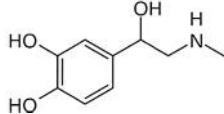
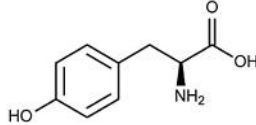
μ	pH	μ
	7	
	7	

	7	
-	7	
-	7	
	7	

Πίνακας 20. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (πολυφαινολικά)

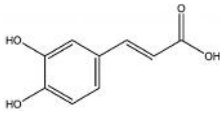
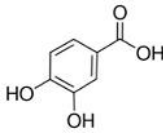
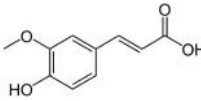
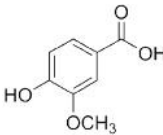
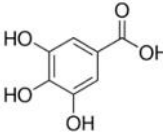
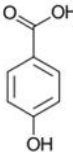
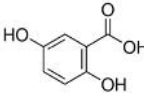
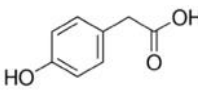
μ	pH	μ
	7	
	7	
	7	

Πίνακας 21. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (αζωτούχα)

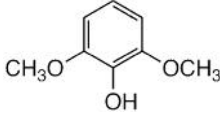
μ	pH	μ
L-DOPA	7	
	7	
L-	7	

D-	7	
----	---	---

Πίνακας 22.Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (οργανικά οξέα)

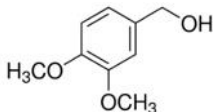
μ	pH	μ
	7	
	7	
	7	
	7	
	6	
-	7	
2,5-	7	
-		

Πίνακας 23.Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (μονοφαινολικά διυποκατεστημένα)

μ	pH	μ
2,6- μ (DMP)	7	

	7	
--	---	---

Πίνακας 24. Υποστρώματα στα οποία μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων ενζύμων (μη φαινολικά)

μ	pH	μ
	7	

1,84 mM) + 25 μL DOPA 10mM.

5.3.3.6. Μέτρηση της ενεργότητας του μεταλλαγμένου ενζύμου

Unit (U). 1

Unit

μ 440 nm μ 4-

4,6 mM 1 min

μ =43 C. μ μ

1 min μ μ μ 230 μL μ 20 μL

μ μ μ μ microplate Spectra Max 250

(Molecular Devices) μ μ 440 nm,

μ 50s 20 min.

pH μ μ

μ μ μ

μ pH,

5.3.3.7. Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών Michaelis- Menten του ενζύμου

Michaelis-

Menten,

ζεταται αλυσω μαθηματικό τι :

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_n + [S]} \quad (B)$$

:

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max} = \frac{u \cdot (K_m + [S])}{[S]}$$

$$[S] = \frac{V_{max} \cdot (K_m + [S])}{u}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} \quad \text{Michaelis-Menten}$$

$$\mu = \frac{V_{max}}{K_m}$$

k_{cat} :

$$\frac{u}{[E_o]} = \frac{K_{cat} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (I)$$

:

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max} = \frac{u \cdot (K_m + [S])}{[S]}$$

$$[S] = \frac{V_{max} \cdot (K_m + [S])}{u}$$

$$[E_o] = \frac{V_{max} \cdot (K_m + [S])}{u}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} \quad \text{Michaelis-Menten}$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_o]}$$

$$\mu = \frac{V_{max}}{K_m}$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} \quad \text{Michaelis-Menten}$$

$$\mu = \frac{V_{max}}{K_m}$$

μ : μ ,
 μ . k_{cat} μ
 μ ,
 μ .
 k_{cat}/K_m μ .
 μ μ μ
 pH=7 (μ Sodium Phosphate).
 μ
 μ Sodium Phosphate pH=7 μ ,
 μ μ μ 5.3.3.4. μ
 μ μ μ
 μ 420 nm. μ
 μ μ μ
 Michaelis-Menten K_m V_{max}
 μ μ μ , μ μμ GraphPad Prism 5.
 μ μ μ μ μ
 μ
 Michaelis-Menten. μ μ
 μ :

Πίνακας 25. Συγκεντρώσεις υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών Michaelis-Menten του μεταλλαγμένου ενζύμου

μ	(mM)
4-	0,2-0,4-0,6-0,8-1-1,4-2-3-4-5-10-15-20
	0,5-1,5-3-4-5-7-10-15-20-30-40-50-60

5.3.3.8. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου (*T-optimum*)

μ μ μ
 μ - eppendorf tubes-
 μ 4- 4,6 mM,
 μ μ μ , 1 mL μ
 μ : 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 C 10 min.

μ tubes μ T=4°C, μ
2 min, . μ
250 μL (tube) μ
μ μ 440 nm. μ
(blank) μ .

5.3.3.9. Προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής pH δράσης του ενζύμου (pH- optimum)

μ μ pH μ
μ 5 mM μ ,
, μ pH 3-9. μ μ
μ μ : Sodium Phosphate,
Tris/HCl Na₂HPO₄/ Citric acid (6).
μ μ μ μ
μ , μ , μ μ ,
5.3.3.4. μ μ μ μ
420 nm.

5.3.3.10. Προσδιορισμός της θερμοσταθερότητας του ενζύμου (T- stability)

μ μ μ μ
μ μ μ μ μ Eppendorf
tubes μ μ , μ μ
Eppendorf Thermomixer Comfort. μ
Eppendorf μ
T=4°C μ . , μ μ
μ μ 5.3.3.4.
μ 40,50,60,70 C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

1.1. Μεταλλάξεις G292N, L306A και Y296V:

μ *Myceliophthora thermophilla*

μ MtOx μ 1,275 kb μ μ μ

pPICZ A, μ 3,6 kb. μ μ

DNA μ 4,875 kb. μ G292N, L306A

Y296V μ μ , μ

μ μ DNA μ . μ μ ,

μ μ , μ DNA

μ PCR μ 4,875 kb.

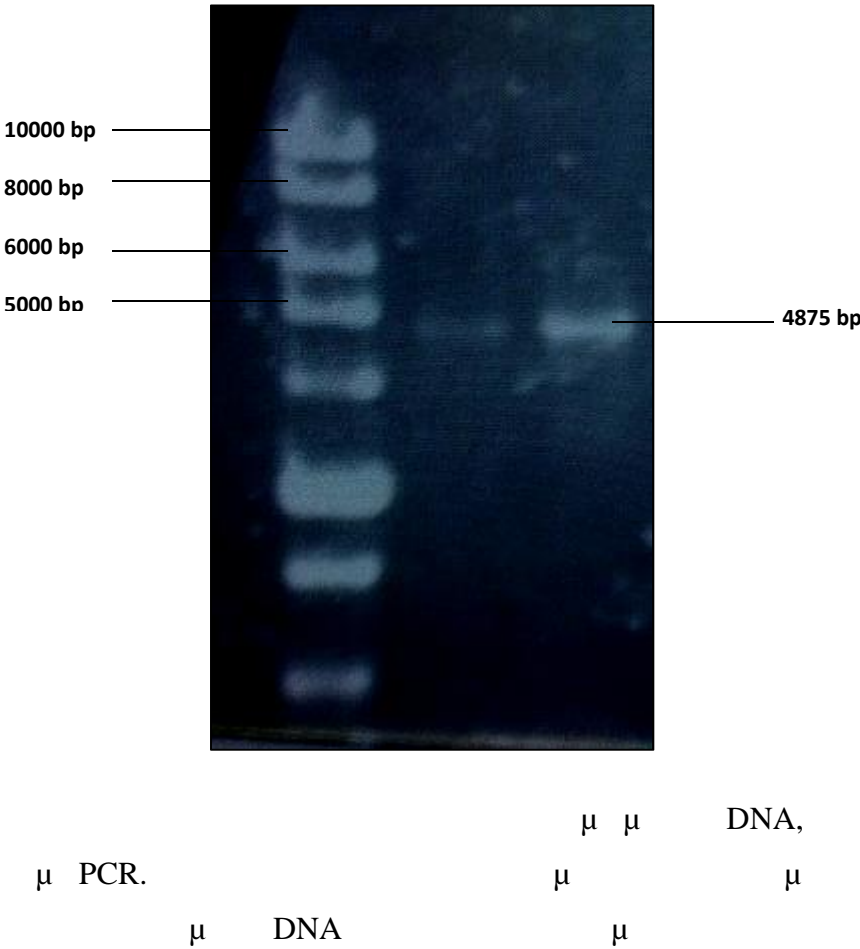
PCR, μ μ , μ

μ DNA μ μ .

30 min 20

μ μ :

Εικόνα 20. Πήκτωμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR μήκους 4875 bp



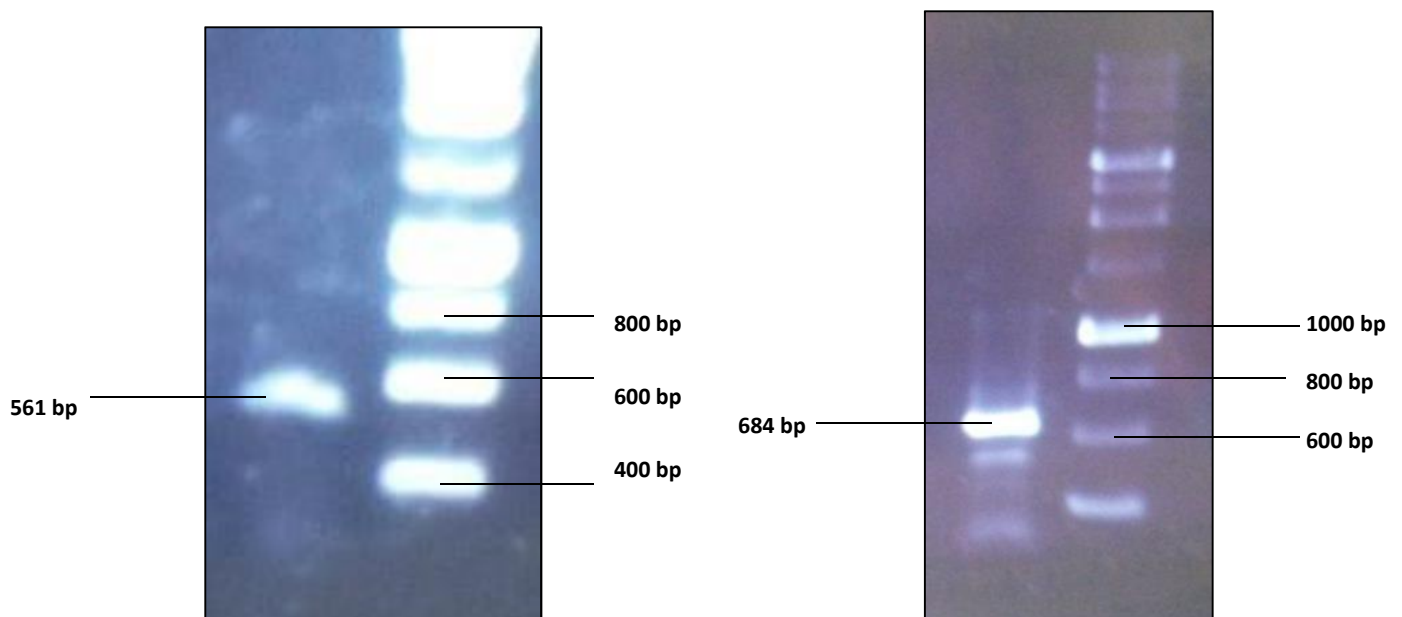
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ 5000 bp. μ μ μ , μ
4875 bp. μ μ
μ PCR μ
μ μ μ . μ
(.).

1.2. Μετάλλαξη MutOx I178-S199:

μ μ μ
μ . μ , μ
PCR, μ μ μ
μ μ DNA . μ μ μ 561
bp 684 bp . PCR μ
μ μ μ μ
μ μ μ μ μ .

Εικόνα 21.. Πήκτωμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR πολλαπλασιασμού του τμήματος DNA μετά την αλληλουχία προς αποκοπή



μ « » ,
μ . μ
μ «DNA» μ .
μ PCR
μ μ μ 1244 bp. μ μ
μ pCR® Blunt,

μ	μ	DNA.	μ	DNA
		<i>E. coli</i> TOP10		
μ	μ	μ	μ	μ
.				
		μ	μ	DNA
		μ		μ
μ	μ	μ	μ	μ
				.

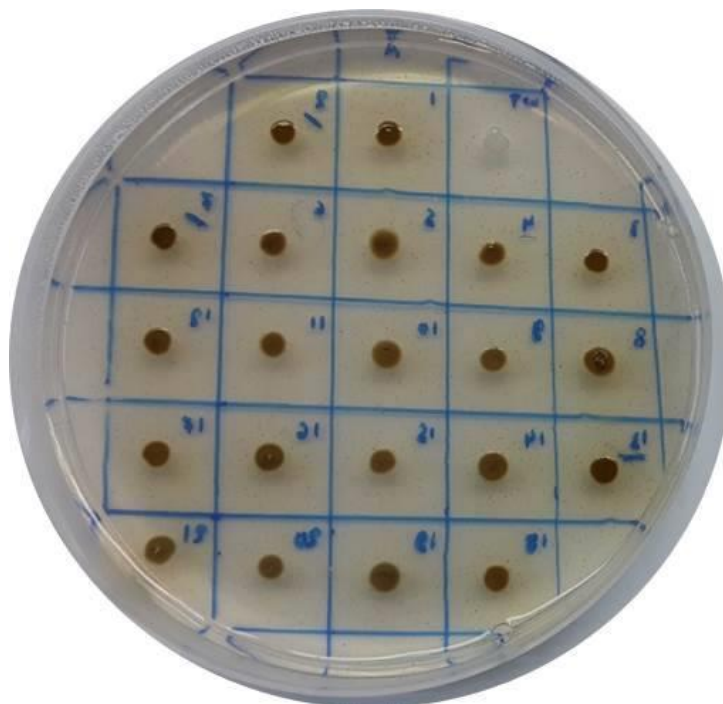
2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *P. pastoris*

2.1. Επιλογή του κατάλληλου κλώνου μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης *P. pastoris* για την παραγωγή της πρωτεΐνης

μ	μ	μ	μ	μ	μ
,				5.2.9.	
.		μ	μ	μ	
		μ		«plate assay» (
5.3.1.).			
μ	μ				
		22:			

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 22. Εφαρμογή plate- assay για την εύρεση του μετασχηματισμένου κλώνου που παρουσιάζει μέγιστη παραγωγικότητα πρωτεΐνης. Η εγγενής περιοχή των κλώνων παρουσιάζει χρωματισμό διαφορετικής έντασης, ανάλογα με την ποσότητα ενζύμου που παράχθηκε από αυτούς. Ο μη μετασχηματισμένος κλώνος έχει άσπρο χρώμα, καθώς δεν παρήγαγε ένζυμο.



μ G292N

,

,

. μ

, μ

.

μ

plate assay

,

5.3.2 μ

μ

μ

50 mL (

).

4 d

T=30°C,

180 rpm.

μ

,

μ

,

μ

,

μ

.

,

5.3.3.4

.

,

,

μ

μ

μ

μ

μ

-33.

μ

μ

.

μ

μ

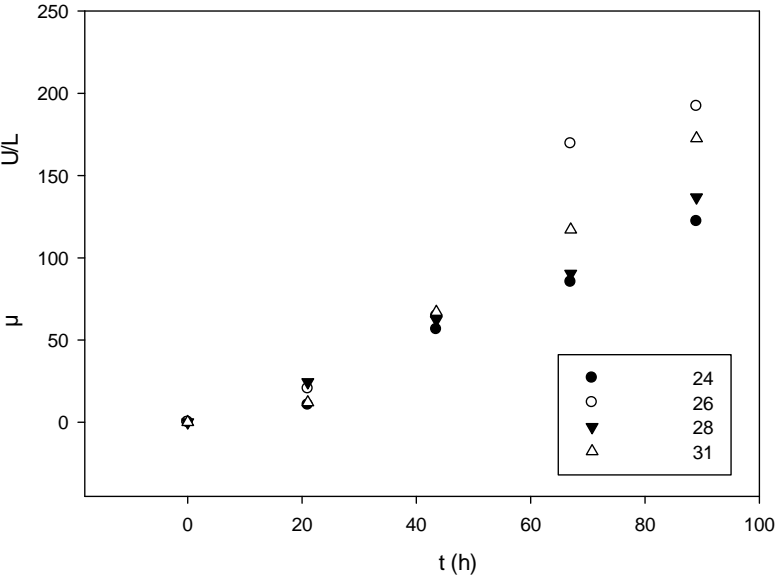
μ

-33

μ -

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

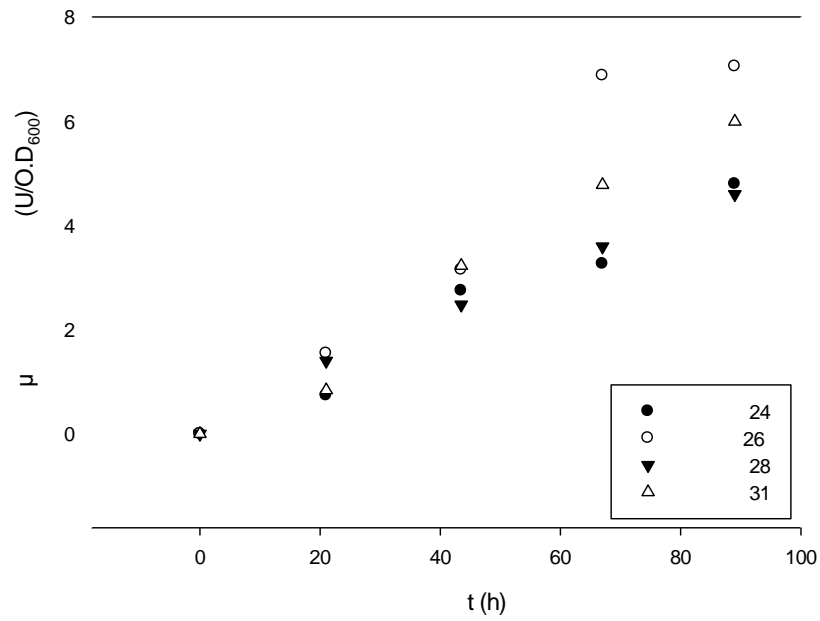
μ μ μ μ . μ μ , μ μ μ
μ μ μ μ μ μ μ
μ . μ
μ , μ , :



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ενεργότητας του υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας κάθε μετασχηματισμένου κλώνου που επιλέχθηκε, προς το συνολικό όγκο καλλιέργειας, συναρτήσει του χρόνου

μ , μ μ
μ , μ μ μ
μ , 5.3.2.2. μ
μ μ O.D.₆₀₀
μ « μ » ,
μ . μμ :

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ανηγμένης ενεργότητας του υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας κάθε μετασχηματισμένου κλώνου που επιλέχθηκε, προς το κυτταρικό φορτίο καλλιέργειας, συναρτήσει του χρόνου

$\mu\mu$ 1
 26 μ
 μ ,
 μ μ . ,
 μ , μ , μ
 μ μ .
 , μ
 μ ,
 . 26
 μ μ MutOx1.
 μ μ
 μ μ μ μ
 «plate assay». μ
 . 5 μ μ
 MutOx2 . 6
 μ μ MutOx3.

2.2. Υπολογισμός της παραγωγής πρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου της υγρής καλλιέργειας

μ μ μ μ μ μ μ 280
nm μ μ μ .
μ ,
μ .
μ μ μ μ
μ . μ
μ 26:

Πίνακας 26. Τιμή της παραγωγής ενζύμου κάθε καλλιέργειας

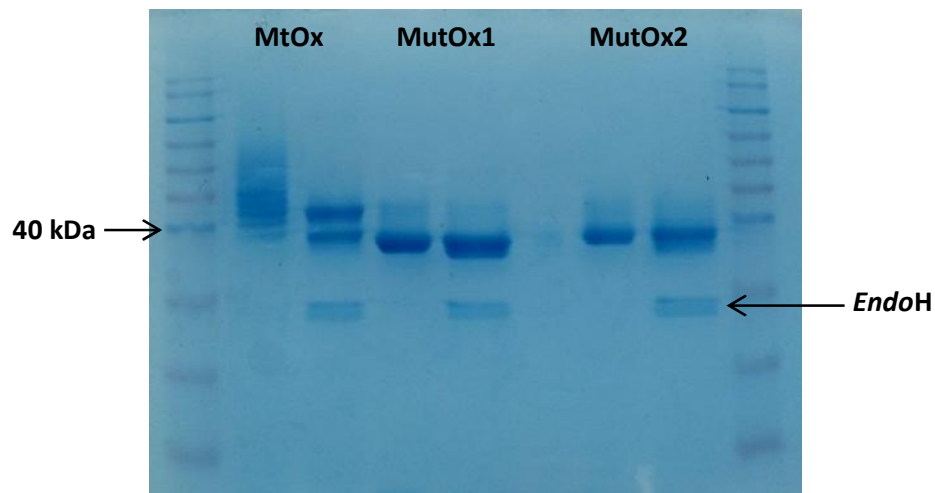
	(g/L .)
MtOx	0,04
MutOx1	0,14
MutOx2	0,04
MutOx3	0,05

3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.1. Προσδιορισμός του μεγέθους της ανασυνδυασμένης μεταλλαγμένης πρωτεΐνης

μ μ μ
μ μ μ SDS-PAGE,
μ . μ μ
μ μ μ
μ . μ μ
(. 5.3.3.2.2.-5.3.3.2.4.
« »). μ
μ , 5.3.3.2.4. 23
μ μ μ :

Εικόνα 23. Πήκτωμα SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. Στην πάνω εικόνα φαίνεται το πήκτωμα το οποίο εμβαπτίστηκε σε υπόστρωμα χλωροκατεχόλης, απουσία αποδιατακτικών παραγόντων (αριστερά το ένζυμο πριν την απογλυκοζυλίωση και δεξιά το απογλυκοζυλιωμένο). Στην κάτω εικόνα φαίνεται το πήκτωμα SDS-PAGE στο οποίο πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Δεξιά και αριστερά φαίνεται η δέσμη των πρωτεϊνικών μορίων του πρότυπου διαλύματος και στο κέντρο τα άγνωστα δείγματα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης



84

MutOx2

μ .

μ μ , μ μ

μ μ .

μ μ ,

μ . 46,5 kDa,

μ μ . μ μ

« » μ μ

μ μ μ ,

μ μ μ

μ μ μ .

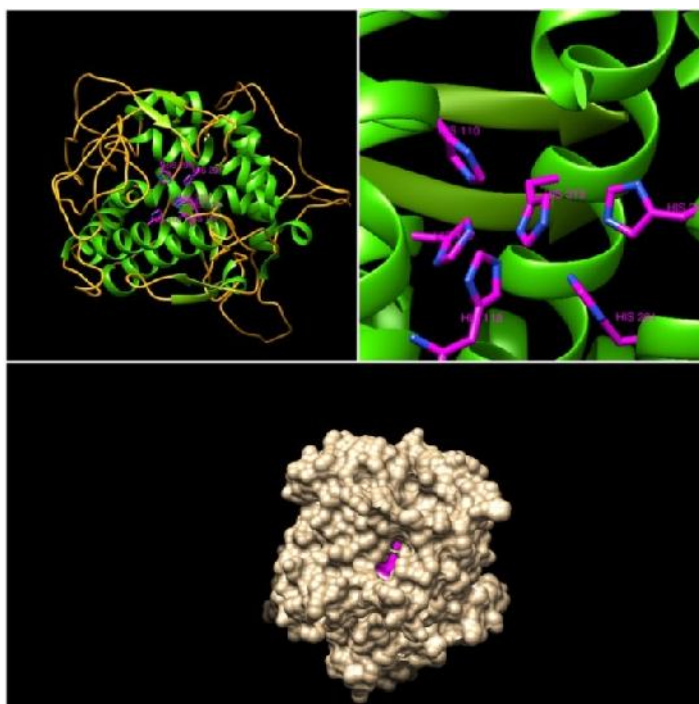
μ μ ,

μ .

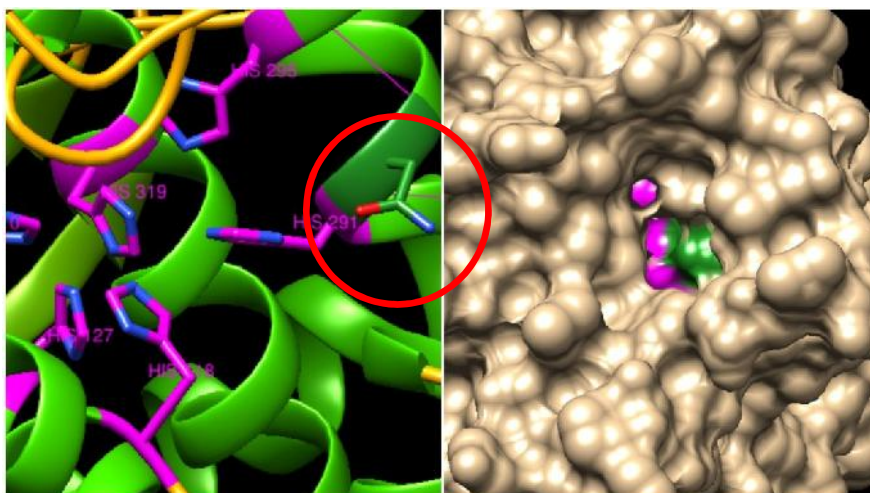
3.2. Προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής της αρχικής PPO και των μεταλλάξεων αυτής

5.3.3.3. 24-28:

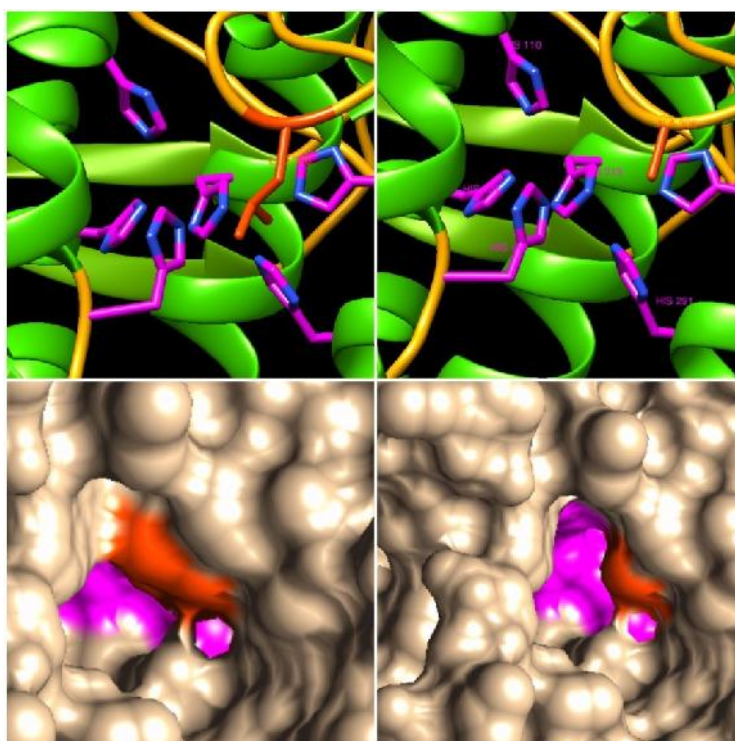
Εικόνα 24. Τριτοταγής δομή της μη μεταλλαγμένης πρωτεΐνης MtOx. Πάνω αριστερά απεικονίζεται το συνολικό μόριο πρωτεΐνης, στο οποίο διακρίνονται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και τα αμινοξέα His που συντονίζουν τα 2 ιόντα Cu (βιολετί). Πάνω δεξιά απεικονίζεται η δομή του ενεργού κέντρου. Κάτω φαίνεται η επιφάνεια του μορίου της πρωτεΐνης. Με βιολετί επισημαίνονται πάλι τα αμινοξέα His του ενεργού κέντρου, επομένως η χρωματιστή κοιλότητα αντιστοιχεί πιθανότατα στην είσοδο προς το ενεργό κέντρο.



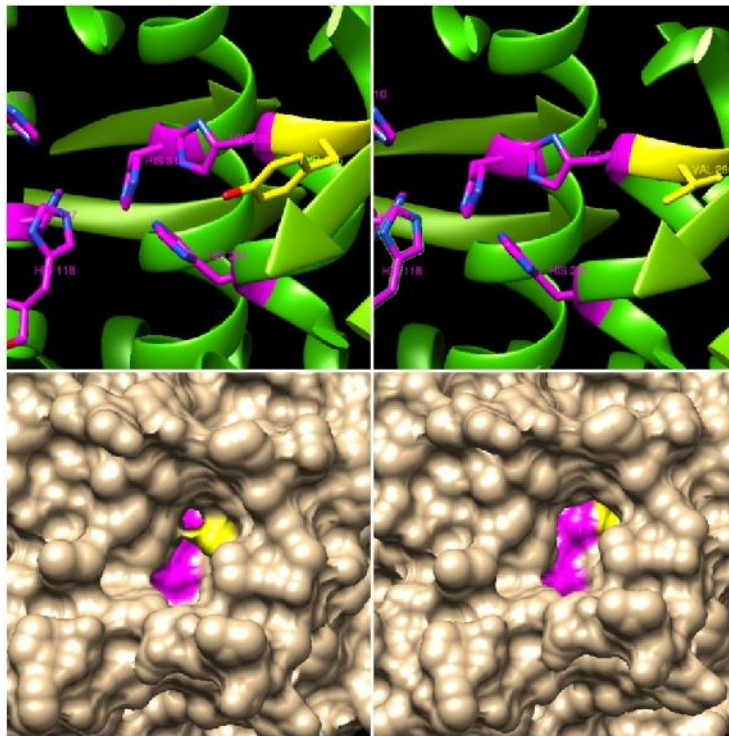
Εικόνα 25. Τριτοταγής δομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης MutOx1. Αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, στο οποίο διακρίνονται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές και τα αμινοξέα His που συντονίζουν τα 2 ιόντα Cu (μπλε), καθώς και το αμινοξύ της Asn που έχει αντικαταστήσει τη Gly. Το αμινοξύ που υπέστη μετάλλαξη βρίσκεται πάνω από την είσοδο του ενεργού κέντρου, όπως φαίνεται στη δεξιά εικόνα και σύμφωνα με προηγούμενες θεωρίες σταθεροποιεί μέσω αλληλεπιδράσεων το μόριο οξυγόνου εντός του ενεργού κέντρου. Στην εικόνα αριστερά διακρίνεται επιπλέον το άτομο του οξυγόνου (κόκκινο) και αυτό του αζώτου (μπλε), που ανήκουν στο αμινοξύ Asn και ευθύνονται για τις αναπτυσσόμενες αλληλεπιδράσεις.



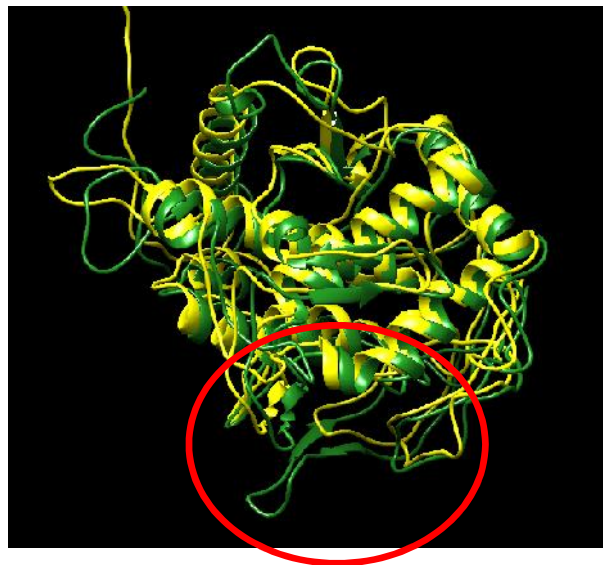
Εικόνα 26. Πάνω αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του MtOx, ενώ πάνω δεξιά το ενεργό κέντρο του MutOx2. Με σκούρο πορτοκαλί χρώμα διακρίνεται το αμινοξύ Leu306 που έχει αντικατασταθεί στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη από το Ala306. Από τις κάτω εικόνες είναι φανερό πως η αντικατάσταση της Leu με τη μικρότερη σε μέγεθος Ala «απελευθερώνει» μερικώς την είσοδο στο ενεργό κέντρο.



Εικόνα 27. Πάνω αριστερά απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του MtOx και το αρχικό ογκώδες αμινοξύ της Tyr296, ενώ πάνω δεξιά το ενεργό κέντρο του MutOx3 με το αμινοξύ Val296 (κίτρινο). Από τις εικόνες της κοιλότητας που οδηγεί στο ενεργό κέντρο κάθε ενζύμου (κάτω) διακρίνεται η μειωμένη παρεμπόδιση που προκαλεί το μεταλλαγμένο αμινοξύ Val296, συγκριτικά με την Tyr.



Εικόνα 28. Σύγκριση των δομών του αρχικού ενζύμου MtOx και του μεταλλαγμένου ενζύμου MutOx4. Εντός του κύκλου φαίνεται ο βρόγχος των 11 αμινοξέων που λείπει από το μεταλλαγμένο ένζυμο



μ

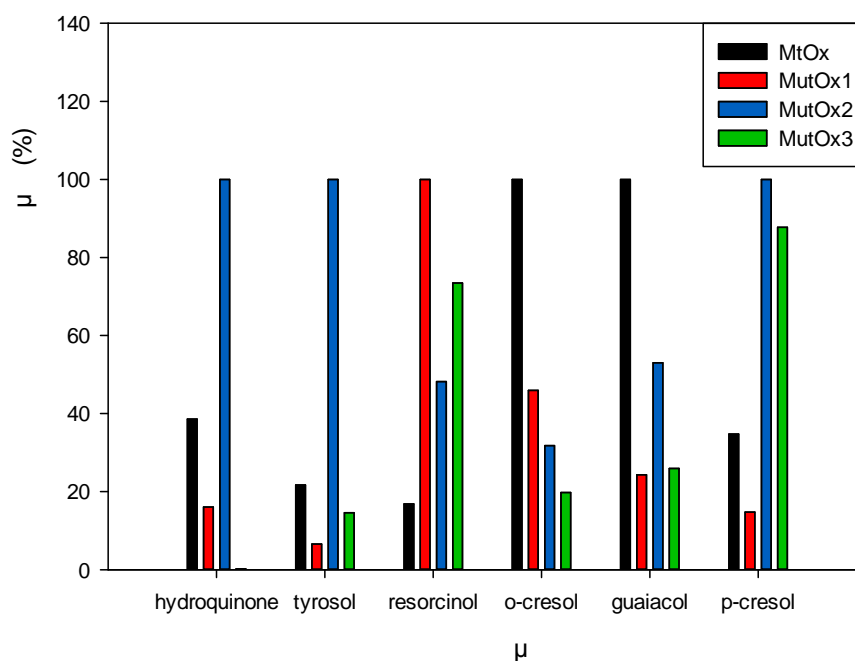
L306 296V

μ G292N μ μ μ

3.3. Δράση σε διαφορετικά υποστρώματα

5.3.3.3 « ».

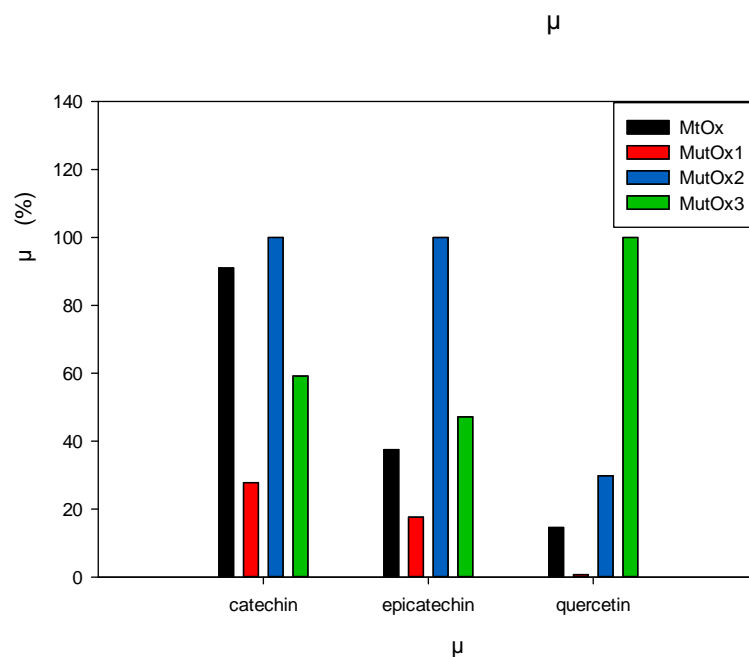
μ 4-8:



Διάγραμμα 3. Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα μονοφαινολικά, μονοϋποκατεστημένα υποστρώματα

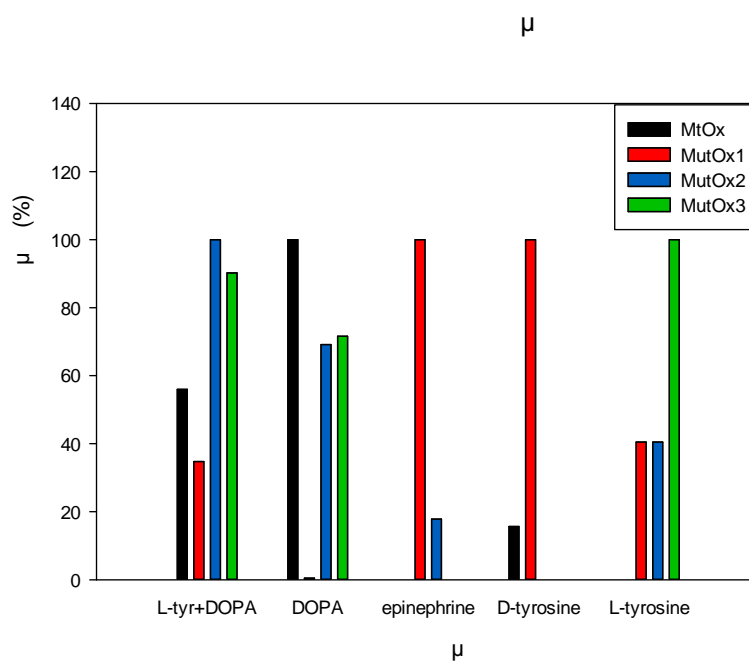
MutOx2

MutOx1



Διάγραμμα 4.Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα πολυφαινολικά υποστρώματα

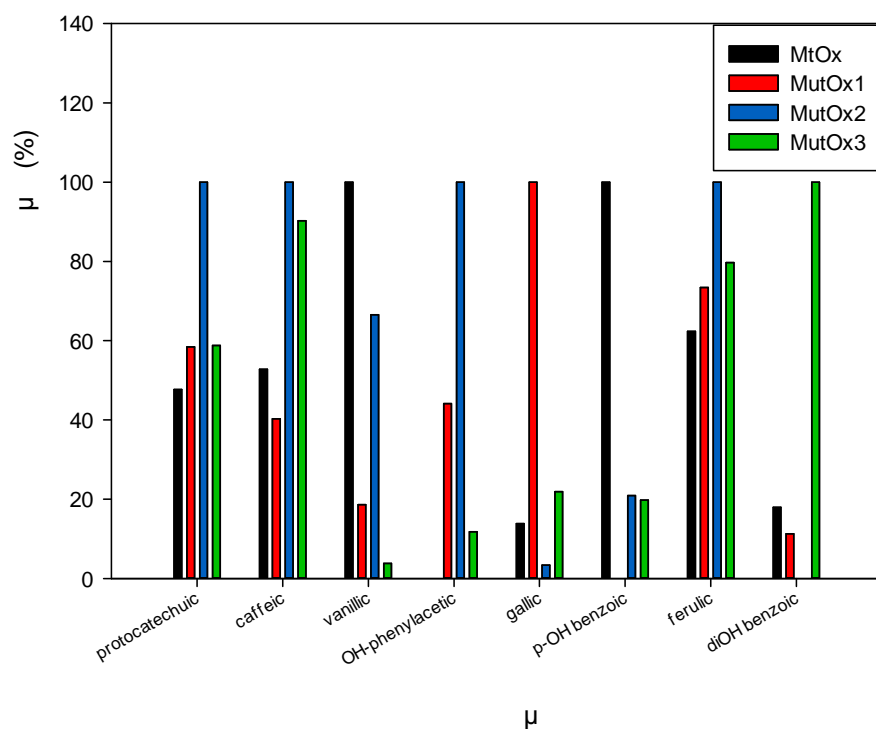
MutOx3 MutOx2 μ , μ . μ 600% μ . μ MutOx2.



Διάγραμμα 5.Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε αζωτούχα υποστρώματα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ MutOx2 μ
 μ L- , μ L-DOPA, μ
 μ L-
 μ L-DOPA L- , μ
 μ MutOx
MutOx3 , D- MutOx1.
 μ μ
MutOx1 MutOx2. μ
 μ μ MtOx.



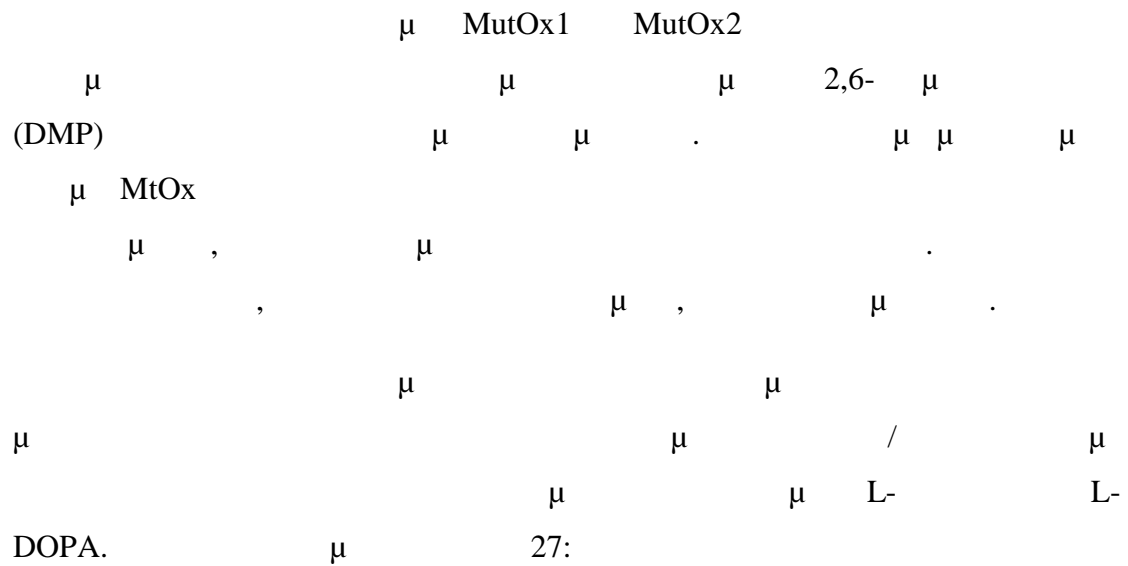
Διάγραμμα 6. Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων σε διάφορα οργανικά οξέα ως υποστρώματα

μ MtOx μ
 μ - ,
 μ μ
 μ MutOx1 μ
 μ (μ 600% μ MtOx)
MutOx3 (450%). μ μ
 μ MutOx2 μ

Bar chart showing the percentage of oxidation products (MtOx, MutOx1, MutOx2, MutOx3) for four compounds: DMP, vanillin, Veratryl alcohol, and pyrogallol. The y-axis represents the percentage from 0 to 140. The legend indicates: MtOx (black), MutOx1 (red), MutOx2 (blue), and MutOx3 (green).

Compound	MtOx (%)	MutOx1 (%)	MutOx2 (%)	MutOx3 (%)
DMP	100	0	0	60
vanillin	88	7	18	100
Veratryl alcohol	100	22	16	66
pyrogallol	0	95	72	100

Διάγραμμα 7.Ραβδόγραμμα σχετικής ενεργότητας των εξεταζόμενων ενζύμων στα υποστρώματα πυρογαλλόλη, βερατριλική αλκοόλη, βανιλίνη και 2,6-διμεθοξυφαινόλη



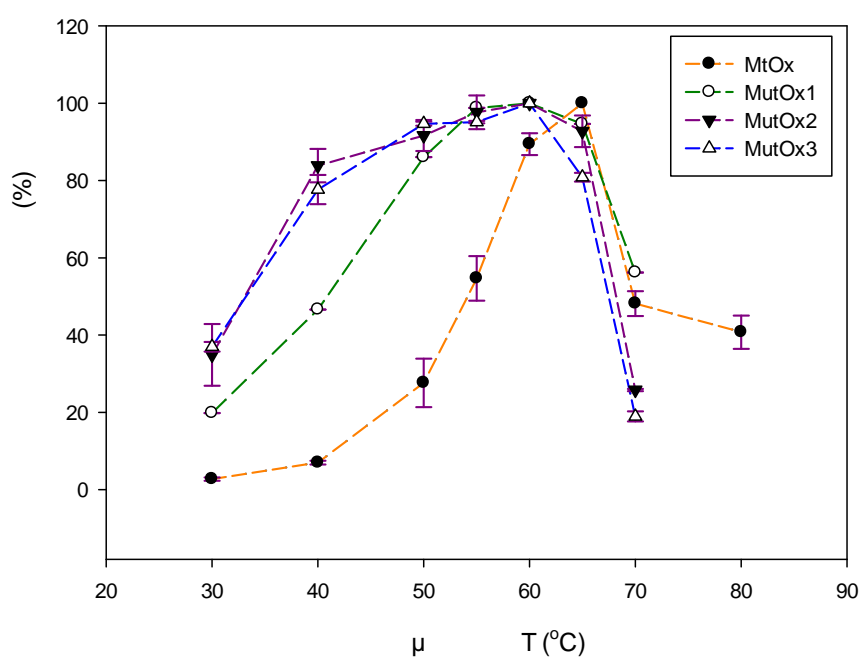
Πίνακας 27. Προσδιορισμός του λόγου δράσης μονοφαινολάσης/διφαινολάσης των εξεταζόμενων ενζύμων

μ /			
MtOx	MutOx1	MutOx2	MutOx3
0.00	1.89	0.01	0.03

3.4. Θερμικά χαρακτηριστικά

3.4.1. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του μεταλλαγμένου ενζύμου

5.3.3.6. .



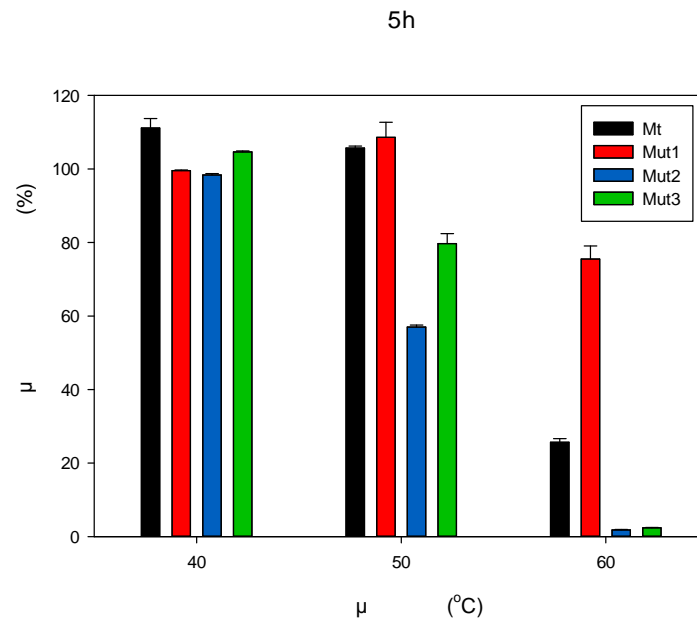
Διάγραμμα 8. Συνδυαστικό διάγραμμα σχετικής ενεργότητας κάθε ενζύμου συναρτήσει της θερμοκρασίας αντίδρασης

μμ 12 μ μ μ
 μ μ μ μ 60 C-65°C. μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ 60°C, , μ μ μ μ μ
 μ 65 C.

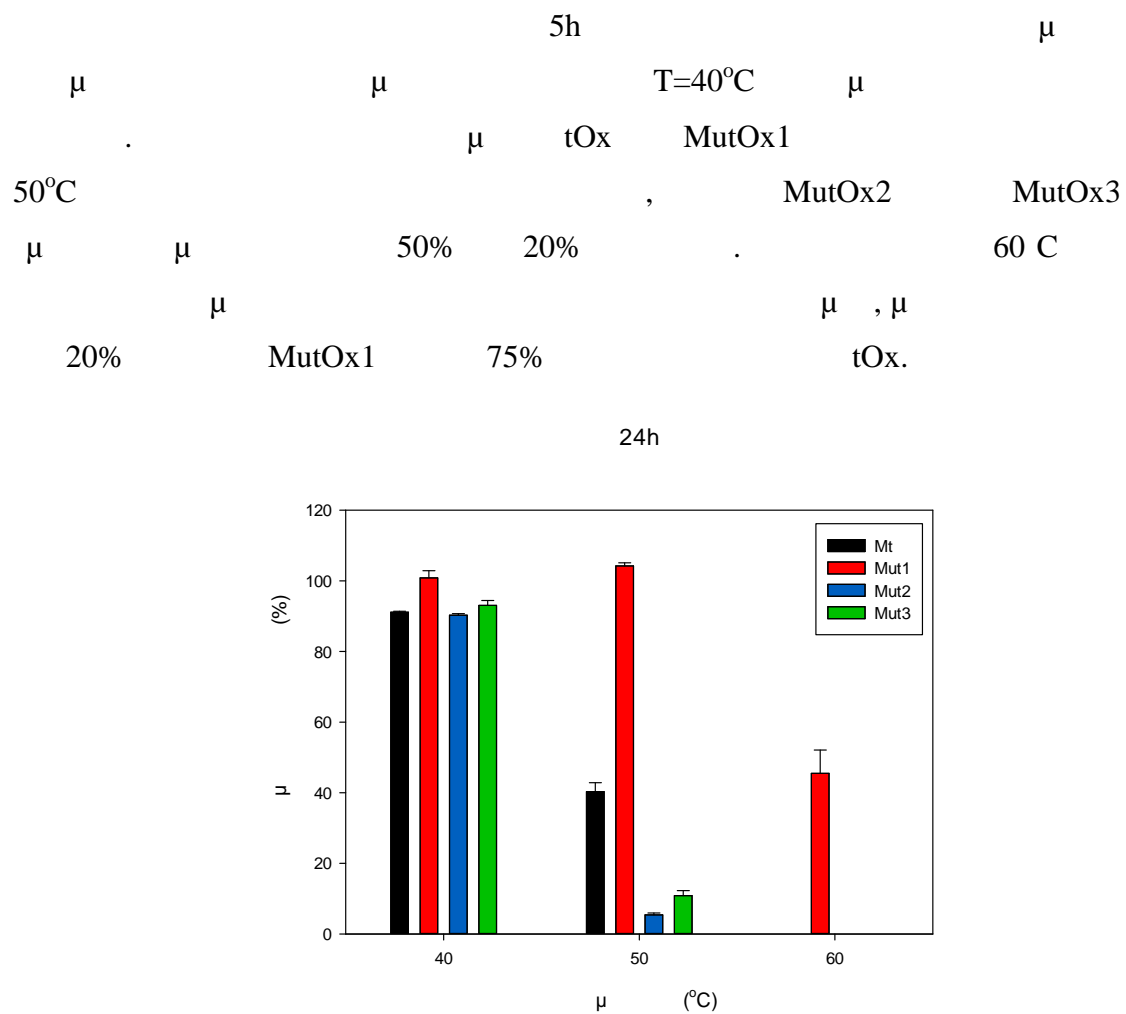
3.4.2. Θερμοσταθερότητα των ενζύμων

μ μ μ μ
 μ 5.3.3.8 μ
 . μ μ μ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Διάγραμμα 10. Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μεταβολής ενεργότητας κάθε ενζύμου σε σταθερή θερμοκρασία επώασης T=40,50 & 60°C για 5h



Διάγραμμα 11. Ραβδόγραμμα απεικόνισης της μεταβολής ενεργότητας κάθε ενζύμου σε σταθερή θερμοκρασία επώασης T=40,50 & 60oC για 24h

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

24h μ T=40°C μ MtOx,
MutOx2 MutOx3 μ μ
(10%), μ μ μ MutOx1 .
μ μ 50°C,
μ 60%. μ
90-95%. μ (24 h) 60°C, μ μ
MutOx1, , 50% .

3.5. Βέλτιστη τιμή pH δράσης

μ pH μ
μ 5.3.3.7.
μ pH
μ .
μ μ .
μ , μ :

Πίνακας 28. Βέλτιστη τιμή pH δράσης κάθε ενζύμου (διευκρινίζεται και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε)

μ	μ pH	μ μ
MtOx	8	Sodium Phosphate
MutOx1	6	Na ₂ HPO ₄ /
MutOx2	6	Sodium Phosphate
MutOx3	8	Sodium Phosphate

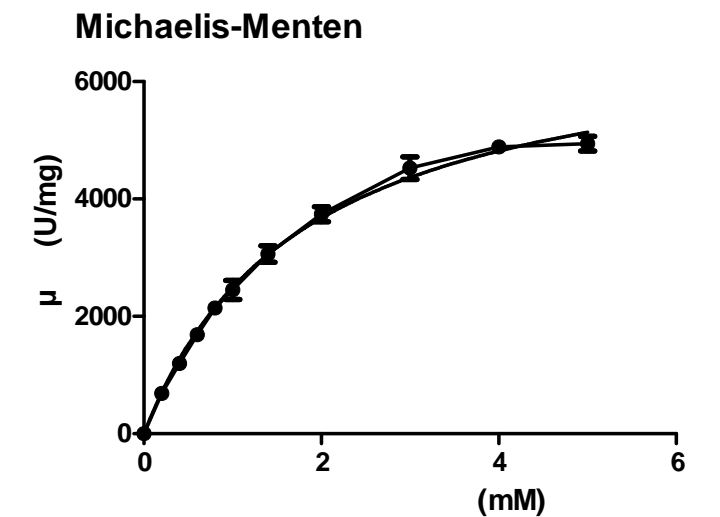
3.6. Κινητικές σταθερές

μ μ μ
MutOx1, MutOx2 MutOx3, MtOx
5.3.3.5 , μ
4- μ ,
μ μ μ
μ μ
μ μ
μ μ μ
μ μ Michaelis-

Menten μ μ Graphpad Prism 5. μ

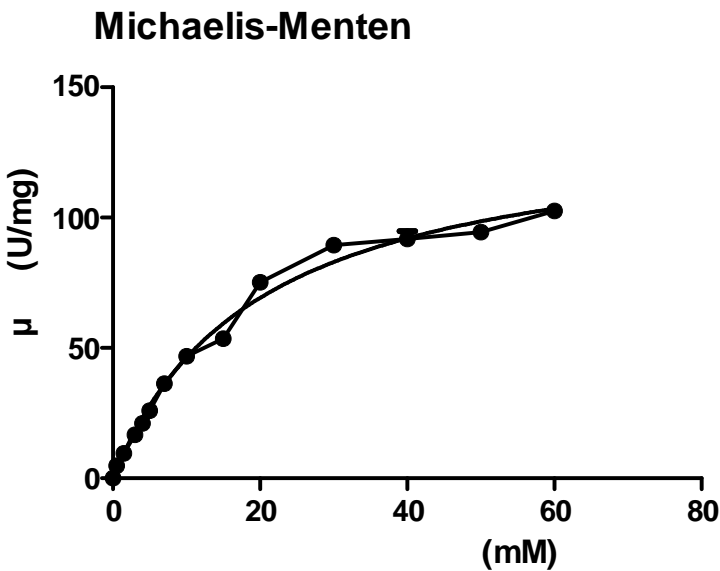
μ μ MtOx:

μ :



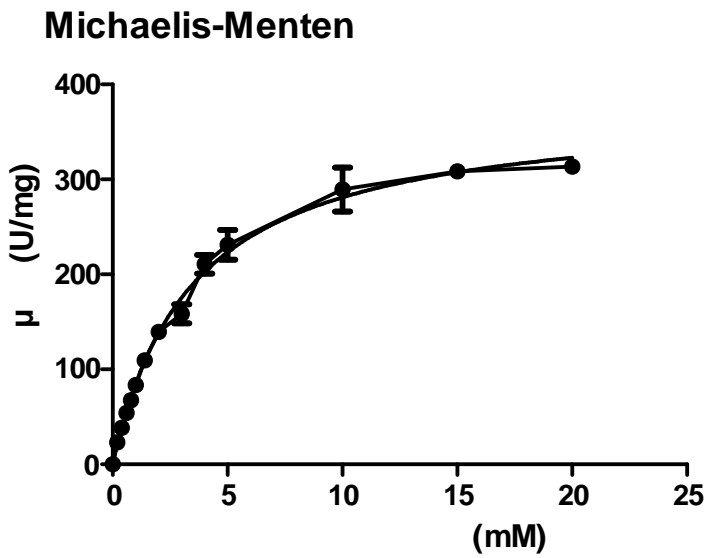
Διάγραμμα 12. Διάγραμμα Michaelis-Menten του MtOx σε χλωροκατεχόλη

μ :



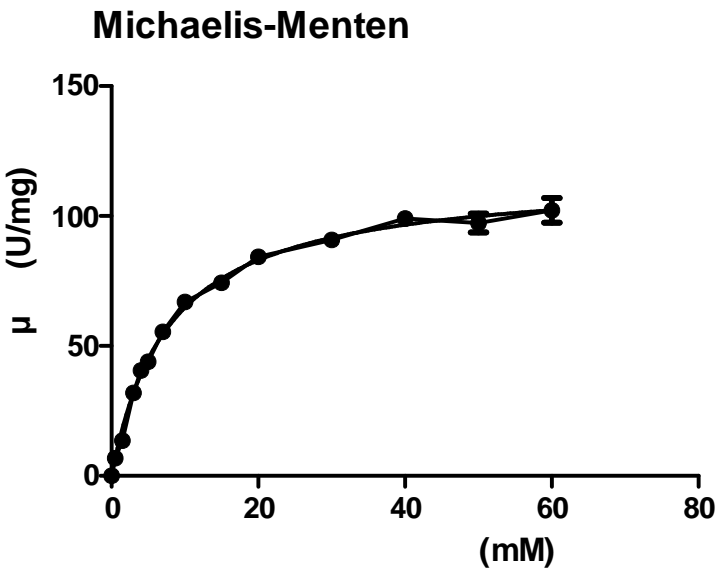
Διάγραμμα 13.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MtOx σε κατεχόλη

_____ μ MutOx1:
_____ μ _____ :



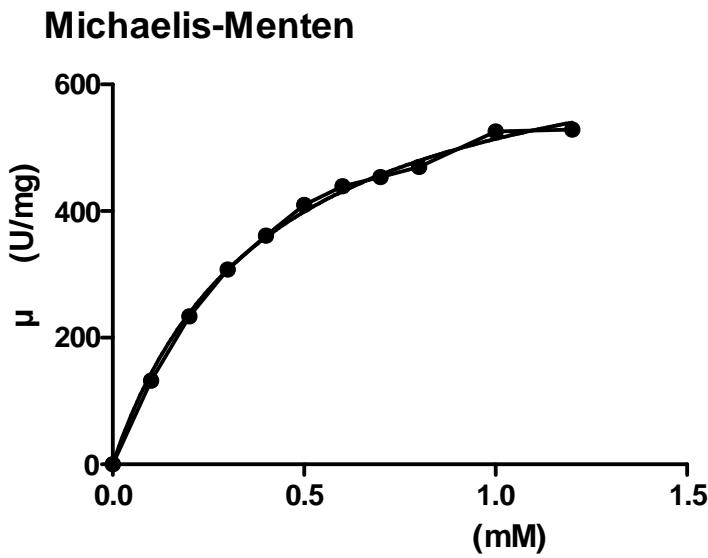
Διάγραμμα 14.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx1 σε χλωροκατεχόλη

_____ μ _____ :



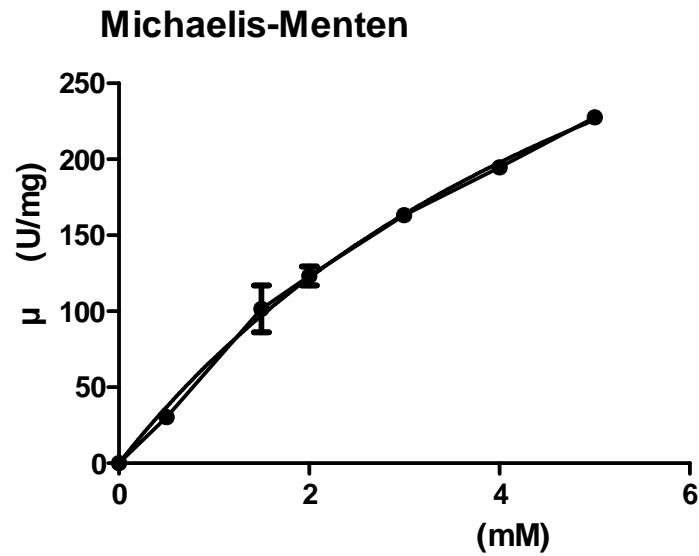
Διάγραμμα 15.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx1 σε κατεχόλη

μ MutOx2:
 μ :



Διάγραμμα 16.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx2 σε χλωροκατεχόλη

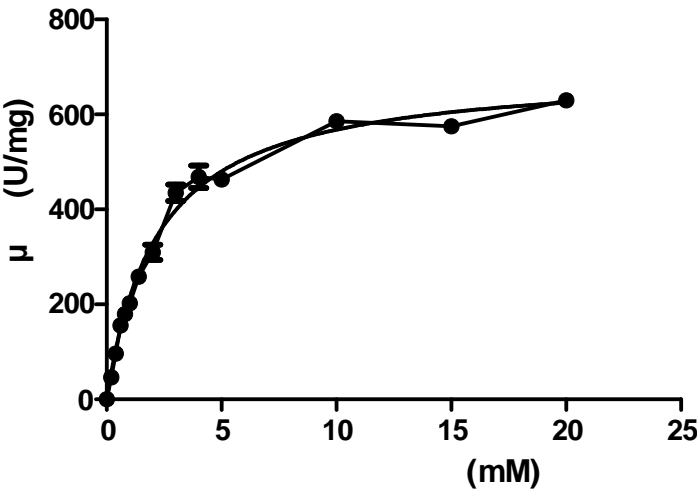
μ :



Διάγραμμα 17.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx2 σε κατεχόλη

_____ μ MutOx3:
 μ :

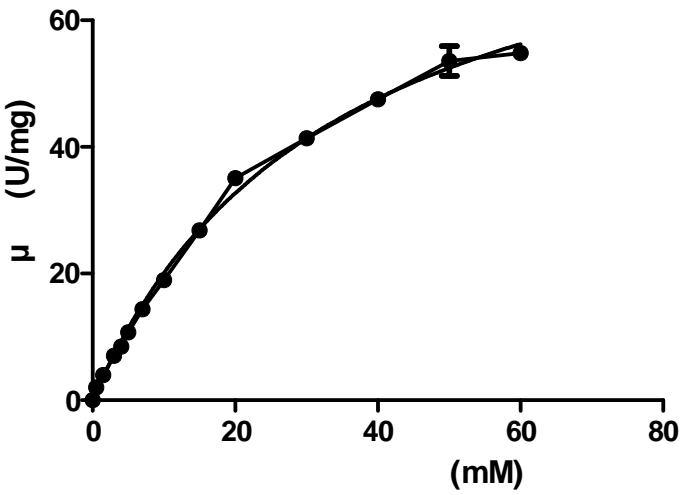
Michaelis-Menten



Διάγραμμα 18.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx3 σε χλωροκατεχόλη

μ :

Michaelis-Menten



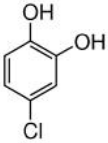
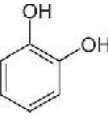
Διάγραμμα 19.Διάγραμμα Michaelis-Menten του MutOx3 σε κατεχόλη

Michaelis- Menten μ μ μ ,
 μ . V_{max} K_m

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ (), K_{cat} , μ
μ μ ().

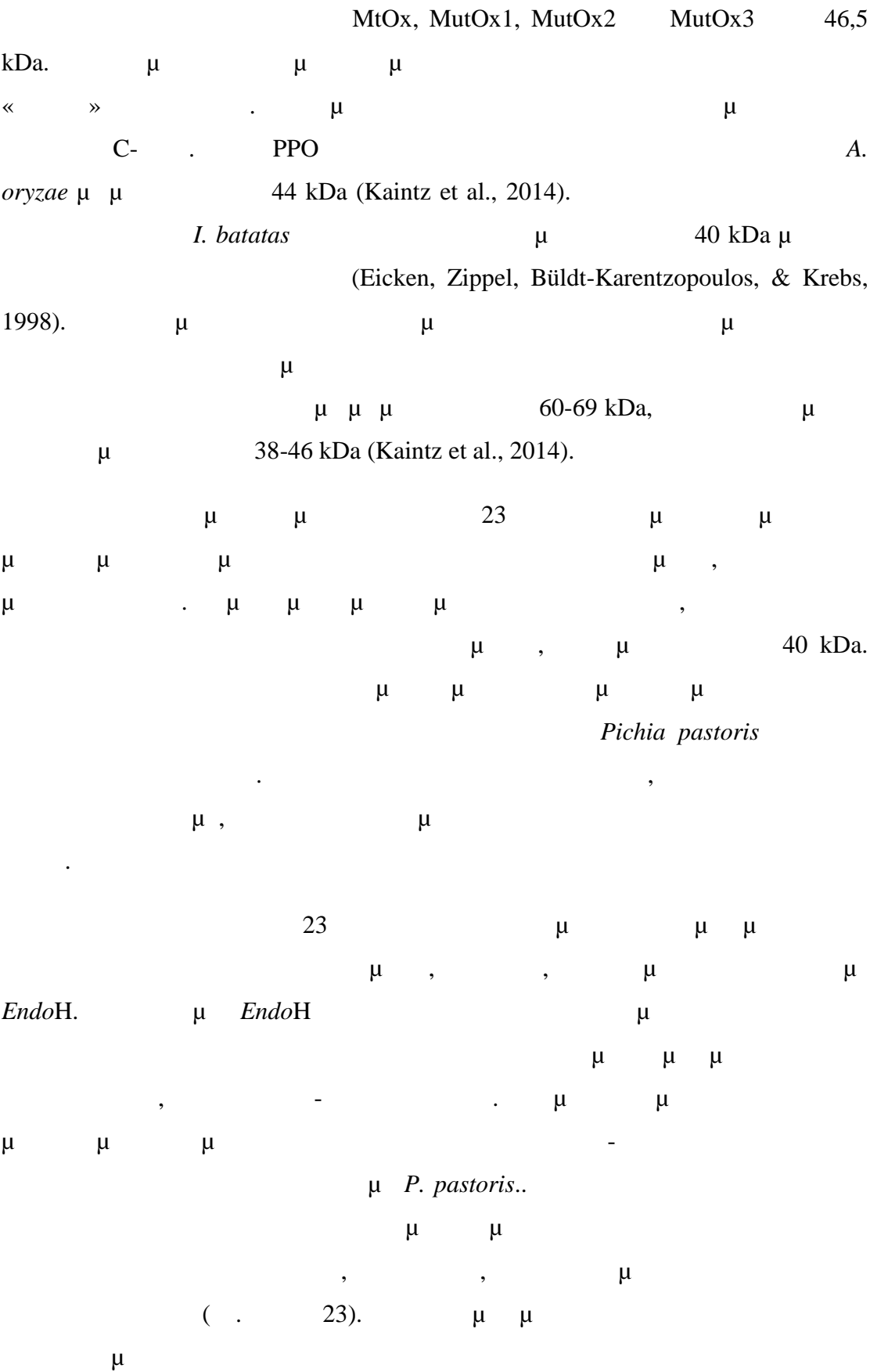
Πίνακας 29. Κινητικές σταθερές Michaelis- Menten των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών MutOx1, MutOx2 και MutOx3 για τα υποστρώματα χλωροκατεχόλη και κατεχόλη

μ	μ	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
	MtOx	6986,0±182,7	1,8±0,1	5414,2±141,6	3006,2±197,7
	MutOx1	379,0±8,0	3,5±0,2	293,7±6,2	84,3±5,1
	MutOx2	722,3±17,0	0,4±0,0	599,8±13,2	1380,5±87,9
	MutOx3	930,2±65,1	9,1±1,3	720,9±50,4	79,3±12,7
	MtOx	137,4±5,8	19,7±2,0	106,5±4,5	5,4±0,6
	MutOx1	115,6±1,8	7,9±0,4	89,6±1,4	11,4±0,6
	MutOx2	522,5±42,9	6,6±0,8	404,9±33,2	61,7±9,3
	MutOx3	87,9±3,0	33,8±2,3	68,1±2,3	2,0±0,2

μ 29 μ
μ μ MutOx2, μ
 $K_m=0,4\text{mM}$, μ μ μ μ
μ MtOx. μ MutOx2
, μ - μ ,
μ .
(k_{cat}/K_m) μ μ μ μ ,
MutOx2. μ μ μ
μ μ 4- ,
μ k_{cat}/K_m μ .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε πηκτή
ακρυλαμίδιου SDS- PAGE:



μ *EndoH* ,
 . μ
 μ μ μ μ μ
 μ μ - , *EndoH*
 μ
 μ μ μ .
 μ μ μ
 μ MtOx μ μ
 μ (μ μ μ) μ ,
 -
 μ .

2. Κατηγοριοποίηση του ενζύμου:

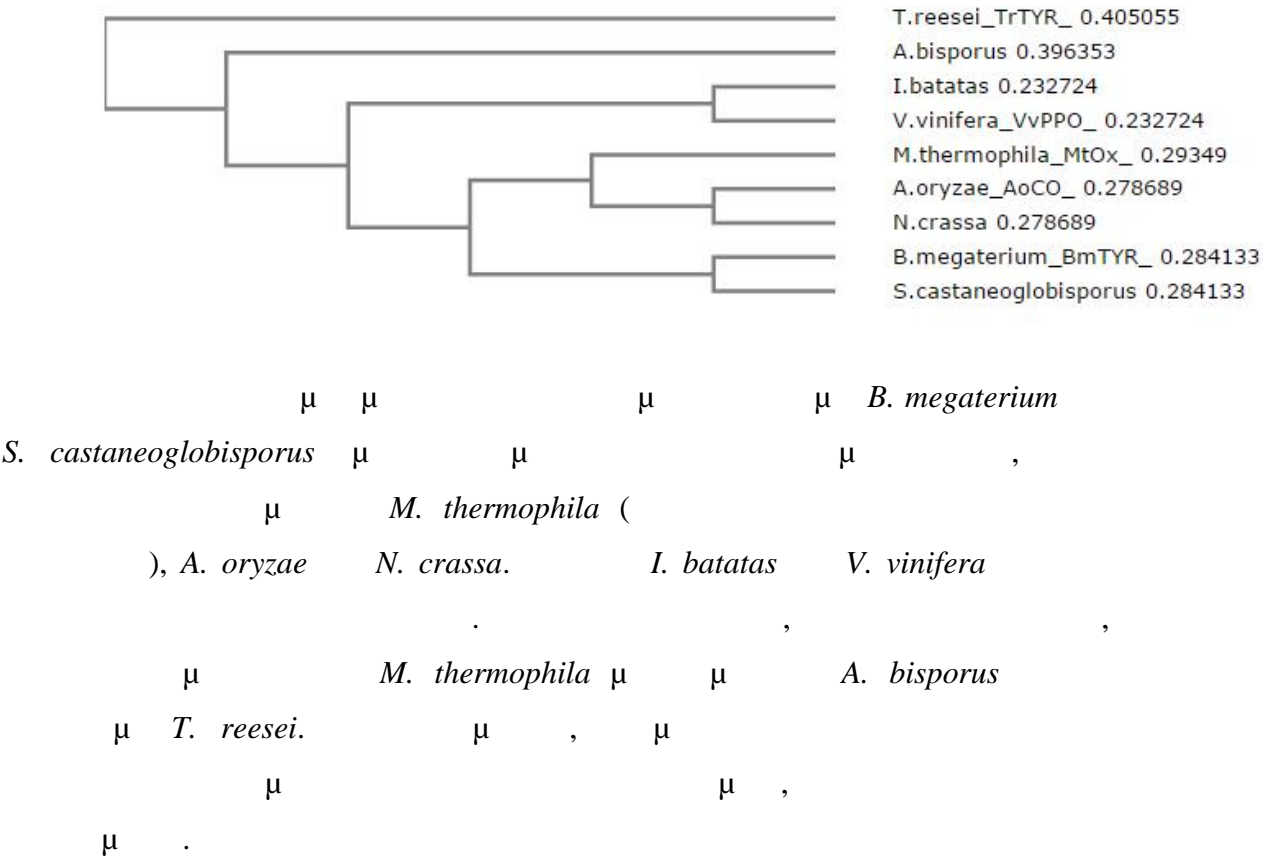
μ MtOx, μ
 « » ()
 .
 PPOs μ μ C-
 μ . μ
 μ μ MtOx μ μ - (7)- - (8)- (.
 MtOx « »)
 Cu(A) μ Cys μ His
 Cu(A). « »
 μ 6 μ Cys
 (Gasparetti et al., 2010). MtOx μ μ
 5 μ . μ
 μ *A. oryzae* μ μ μ μ
 μ . (Hakulinen et al., 2013).
 μμ MtOx μ
 PPOs, AoCO μ μ μ μ
 MtOx *M. thermophila* (45% μ).
 PPOs,
 μ *Myceliophthora thermophila*,
 μ μ , μ μ
 μ μ *Streptomyces*.
 μ μ μ , 30 kDa, μ

C-
(Claus & Decker, 2006).
A.
bisporus *P. nameko*
(Selinheimo et al., 2009).
Neurospora crassa *Trichoderma reesei* (Faccio, Arvas, Thöny-Meyer, & Saloheimo, 2013).

3. Συμπεράσματα σχετικά με την εξελικτική σχέση
μικροοργανισμών που παράγουν PPOs:

Clustal Omega
UPGMA
PPOs

Εικόνα 29. Φυλογενετικό δέντρο ορισμένων μυκήτων, βακτηρίων και φυτών (εξάγεται με βάση την πεπτιδική αλληλουχία των PPOs που παράγουν)



4. Κινητικές παράμετροι:

The study investigated the effect of L306A on the activity of PPOs in *Morus alba* L. and *Cynara scolymus* L. The results showed that L306A significantly inhibited the activity of PPOs in both plant species. The inhibition was more pronounced in *Morus alba* L. than in *Cynara scolymus* L. The study also found that the inhibition of PPOs by L306A was reversible. The Michaelis-Menten kinetics of PPOs were determined, and the results showed that L306A increased the apparent K_m of PPOs in both plant species. The K_m values for PPOs in *Morus alba* L. and *Cynara scolymus* L. were 19,7±2,0 mM and 19,81 mM, respectively. The K_m values for PPOs in the presence of L306A were 3,20±0,01 mM and 6,6±0,8 mM, respectively. The results suggest that L306A is a non-competitive inhibitor of PPOs.

μ ,
.

5. Εξειδικευμένη δράση σε διάφορα υποστρώματα:

μ
μ μ μ μ
μ .
μ ,
μ , μ L- .
μ μ μ
μ , μ μ . μ ,
μ , μ μ
μ ,
μ μ μ μ μ
μ , μ μ ,
μ μ ,.
μ L306A Y296V μ
μ , μ
, μ μ μ μ
μ . MutOx2 MutOx3, μ
MutOx1, μ μ ,
μ μ .
μ μ
MutOx2 μ μ μ
μ . μ μ μ
μ -
μ (, , -).
μ
μ μ μ μ μ μ μ
μ . -
μ μ μ μ
μ , . μ -

- μ μ μ

, μ μ μ ,

μ μ μ . μ

μ μ μ μ

μ .

,

, μ μ .

μ μ μ MutOx1 μ μ

μ μ μ ,

μ , μ .

μ , μ μ

, μ μ .

MutOx1 μ μ

μ Asn. Asn μ

μ μ μ μ .

μ μ ,

.

μ μ μ ,

μ μ μ MutOx2

μ μ . μ

μ .

μ / μ μ μ

μ , μ .

(29) μ μ

μ μ μ MutOx1. μ μ

μ μ

μ L-DOPA, L- ,

μ .

μ μ μ μ .

μ μ μ μ

μ μ

PPOs μ μ (. . L-

DOPA). PPOs μ
 μ , μ «oxy»
 μ (10-15%)
 μ , μ
 «met» μ , μ «oxy» ,
 (Halaouli, Asther, Sigoillot, Hamdi, & Lomascolo, 2006) (Dalfard et al., 2006).
 μ 4 μ L-
 5 μ μ L-DOPA.

6. Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης:

μ μ MtOx
 , μ μ μμ 9, μ 65 C.
 μ μ 60 C
 μ μ μ . μ μ ,
 μ μ μ . μ μ
 μ PPOs, μ μ
 μ . , μ
Molus Alba L. μ
 μ T=65°C, μ μ
 T= 35°C T=25 C (Arslan et al.,
 2004; Aydemir, 2004; Gawlik-Dziki et al., 2008). μ
 μ
 μ ,
 μ (Guo et al., 2015).

7. Θερμοσταθερότητα:

μ μ μ μ
 MutOx1, μ μ G292N MtOx.
 μ MutOx2. μ T=40°C
 μ μ 24 h. μ
 T= 60°C μ μ MutOx1 50%
 24h. μ μ μ G292N μ
 μ μ .
 μ μ
 μ μ Asn μ .

μ , μ
292 μ
μ .
μ μ μ MutOx1
μ . μ μ
μ μ μ
G292N.
μ
μ μ μ μ
μ . μ
80% 5 min,
μ T=50°C, μ ,
μ , 40 min (Mazzafera & Robinson, 2000) (Gawlik-
Dziki et al., 2008). μ μ
μ μ μ
μ , μ μ Cys
μ μ μ
μ μ
μ (Faccio et al., 2012). μ
5 μ Cys, μ μ
μ
Cys.
μ μ μ , μ μ
μ μ μ μ
μ μ
μ μ μ
μ μ μ 40 C, μ
μ μ μ .
μ μ μ ,
μ
21 h.

μ

8. Βέλτιστο pH δράσης:

μ MtOx MutOx3 pH =8.
 μ MutOx1 MutOx2 pH = 6.
 μ μ pH = 8
 μ μ Sodium Phosphate,
 μ Tris Base/HCl μ μ pH. μ
 P. Mazzafera, S. Robinson 2000 μ
 μ . μ
 μ PH_4^{3-} μ , μ
 μ .
 μ μ Cl^- μ
 μ (Mazzafera & Robinson, 2000).

μ μ μ μ
 pH PPOs
 pH. μ PPO
 μ pH=5-7 (Aydemir, 2004)
 pH= 6-7 (Mazzafera
 & Robinson, 2000).
 μ
Streptomyces polyantibioticus *Streptomyces pharetrae* pH
 μ 7 (Le Roes-Hill, Palmer, Rohland,
 Kirby, & Burton, 2015).
 μ , μ
 pH=8. MtOx MutOx3
 μ μ pH μ
 PPOs.

9. Σύγκριση με την πρωτεΐνη AoCO:

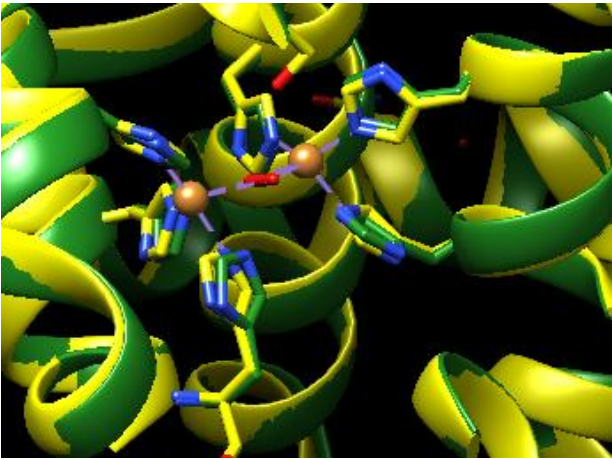
μ PPO Myceliophthora
thermophila MtOx μ Aspergillus oryzae AoCO
μ ,
μ MutOx1, MutOx2 MutOx3.
μ « »
μ C-
μ .

Πίνακας 30. Συγκριτικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ενζύμων της M. thermophila και της κατεχολοξειδάσης του A. oryzae AoCO (Gasparetti et al., 2010)

	MtOx	MutOx1	MutOx2	MutOx3	AoCO4
K_m (mM)	19,7±2,0	7,9±0,4	6,6±0,8	33,8±2,3	3,3
pH	8	6	6	8	5,6*
$t_{1/2}$ (h) $T=50^{\circ}C$	24	>24	5	8	20

* μ -
AoCO4 μ μ
μ M.
thermophila- μ μ μ . μ μ
μ μ . μ μ μ
AoCO4 MtOx, μ μ MtOx
μ AoCO4.
μ μ μ .

Εικόνα 30. Σύγκριση των ενεργών κέντρων των MtOx (με πράσινο) και AoCO4 (με κίτρινο). Οι ιστιδίνες με τις οποίες συντονίζονται τα ιόντα χαλκού βρίσκονται σχεδόν σε όμοια θέση.



μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ 33 (.).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2011). . Nicosia: Broken Hill Publishers LTD
- Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R., & Sayadi, S. (2004). Use of Whole Cells of, 70(4), 2105–2109. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2105>
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S., & Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88(3), 479–484. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.005>
- Aydemir, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87(1), 59–67. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.017>
- Bassalo, M. C., Liu, R., & Gill, R. T. (2016a). Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 39, 126–133. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.016>
- Bassalo, M. C., Liu, R., & Gill, R. T. (2016b). Directed evolution and synthetic biology applications to microbial systems. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.016>
- Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F., & Rompel, A. (2015). The structure of a plant tyrosinase from Walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angewandte Chemie - International Edition*. <http://doi.org/10.1002/anie.201506994>
- Bozzini, T., Botta, G., Delfino, M., Onofri, S., Saladino, R., Amatore, D., ... Palamara, A. T. (2013). Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(24), 7699–7708. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.026>
- Claus, H., & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3–14. <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.012>

- Cobb, R. E., Sun, N., & Zhao, H. (2013). Directed evolution as a powerful synthetic biology tool. *Methods*, 60(1), 81–90. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.009>
- Dalfard, A. B., Khajeh, K., Soudi, M. R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., & Sajedi, R. H. (2006). Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1409–1416. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.029>
- Decker, H., Schweikardt, T., & Tuczec, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: All questions answered? *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(28), 4546–4550. <http://doi.org/10.1002/anie.200601255>
- Eicken, C., Krebs, B., & Sacchettini, J. C. (1999). Catechol oxidase — structure and activity. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 677–683. [http://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00029-9](http://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00029-9)
- Eicken, C., Zippel, F., Büldt-Karentzopoulos, K., & Krebs, B. (1998). Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Letters*, 436(2), 293–299. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01113-2](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01113-2)
- Ercili-Cura, D. (2012). Structure modification of milk protein gels by enzymatic cross-linking, 82.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomas-Barberan, F. A., & Wichers, H. J. (2001). Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1187–1193. <http://doi.org/10.1021/jf001258b>
- Faccio, G., Arvas, M., Thöny-Meyer, L., & Saloheimo, M. (2013). Experimental and bioinformatic investigation of the proteolytic degradation of the C-terminal domain of a fungal tyrosinase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 121, 37–45. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.006>
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 47(12), 1749–1760. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.018>

- Fairhead, M., & Th?ny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183–191.
<http://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.007>
- Flibotte, S., Edgley, M. L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S. E., Rogula, A., ... Moerman, D. G. (2010). Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. <http://doi.org/10.1534/genetics.110.116616>
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., & Decker, H. (2015). Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chemistry*.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.016>
- Gasparetti, C., Faccio, G., Arvas, M., Buchert, J., Saloheimo, M., & Kruus, K. (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: Production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 213–226.
<http://doi.org/10.1007/s00253-009-2258-3>
- Gawlik-Dziki, U., Z?otek, U., & ??wieca, M. (2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chemistry*, 107(1), 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.068>
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Adir, N., & Fishman, A. (2013). Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*.
<http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.021>
- Guo, J., Rao, Z., Yang, T., Man, Z., Xu, M., Zhang, X., & Yang, S.-T. (2015). Enhancement of the thermostability of *Streptomyces kathirae* SC-1 tyrosinase by rational design and empirical mutation. *Enzyme and Microbial Technology*, 77, 54–60. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.002>
- Hakulinen, N., Gasparetti, C., Kaljunen, H., Kruus, K., & Rouvinen, J. (2013). The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8), 917–929.
<http://doi.org/10.1007/s00775-013-1038-9>

- Halaoui, S., Asther, M., Sigoillot, J. C., Hamdi, M., & Lomascolo, A. (2006). Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 219–232. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x>
- Inoue, T., Shiota, Y., & Yoshizawa, K. (2008). Quantum Chemical Approach to the Mechanism for the Biological Conversion of Tyrosine to Dopaoquinone Quantum Chemical Approach to the Mechanism for the Biological Conversion of Tyrosine to Dopaoquinone, (11), 16890–16897. <http://doi.org/10.1021/ja802618s>
- Jäckel, C., Kast, P., & Hilvert, D. (2008). Protein Design by Directed Evolution. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), 153–173. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125832>
- Kaintz, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2014). Type-3 copper proteins: Recent advances on polyphenol oxidases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. <http://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.001>
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12), 1084–1090. <http://doi.org/10.1038/4193>
- Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., & Martínez, A. (2006). Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1002–1008. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03013.x>
- Le Roes-Hill, M., Palmer, Z., Rohland, J., Kirby, B. M., & Burton, S. G. (2015). Partial purification and characterisation of two actinomycete tyrosinases and their application in cross-linking reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 353–364. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.012>
- Lee, S. H., Baek, K., Lee, J. E., & Kim, B. G. (2016). Using tyrosinase as a monophenol monooxygenase: A combined strategy for effective inhibition of melanin formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(4), 735–743. <http://doi.org/10.1002/bit.25855>
- Li, R., Li, N., Wang, Z., Wang, X., & Liu, W. (2015). Characterization of Polyphenol

- Oxidase from Jipicao Yam. *Journal of Food Biochemistry*.
<http://doi.org/10.1111/jfbc.12117>
- Liu, B., Xue, Q., Tang, Y., Cao, J., Guengerich, F. P., & Zhang, H. (2016).
 Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage.
<http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.006>
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006).
 Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is
 flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981–8990.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M509785200>
- Mazzafera, P., & Robinson, S. P. (2000). Characterization of polyphenol oxidase in
 coffee. *Phytochemistry*, 55(4), 285–296. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00332-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00332-0)
- Molitor, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol
 oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of
 plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
 E1806–E1815. <http://doi.org/10.1073/pnas.1523575113>
- Nimpiboon, P., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Nakamura, S., Kidokoro, S. ichi, &
 Pongsawasdi, P. (2016). Mutagenesis for improvement of activity and
 thermostability of amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum*.
International Journal of Biological Macromolecules.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.022>
- Nolan, L. C., & O'Connor, K. E. (2007). Use of *Pseudomonas mendocina*, or
 recombinant *Escherichia coli* cells expressing toluene-4-monooxygenase, and a
 cell-free tyrosinase for the synthesis of 4-fluorocatechol from fluorobenzene.
Biotechnology Letters, 29(7), 1045–1050. <http://doi.org/10.1007/s10529-007-9365-y>
- Olivares, C., & Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and
 catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell &
 Melanoma Research*, 22(6), 750–760. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00636.x>

- Pierre, B., Shah, V., Xiao, J., & Kim, J. R. (2015). Construction of a random circular permutation library using an engineered transposon. *Analytical Biochemistry*, 474, 16–24. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.011>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(3), 586–621. <http://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rolff, M.; Schottenheim, J; Decker, H; Tucek, F. (2011). Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4077–4098. <http://doi.org/10.1039/c0cs00202j>
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinen, M.-L., Steffensen, C. L., Buchert, J., & Kruus, K. (2009). Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.09.013>
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., & Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.048>
- Shuster Ben-Yosef, V., Sendovski, M., & Fishman, A. (2010). Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio. *Enzyme and Microbial Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.08.008>
- Siegbahn, P. E. M. (2004). The catalytic cycle of catechol oxidase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 9(5), 577–590. <http://doi.org/10.1007/s00775-004-0551-2>
- Solem, E., Tucek, F., & Decker, H. (2016). Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angewandte Chemie - International Edition*. <http://doi.org/10.1002/anie.201508534>
- Stoscheck, C. M. (1990). [6] Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50–68. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](http://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)

- Uria, A. R., & Zilda, D. S. (2016). Chapter One – Metagenomics-Guided Mining of Commercially Useful Biocatalysts from Marine Microorganisms. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 78, pp. 1–26).
<http://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.001>
- Virador, V. M., Reyes Grajeda, J. P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G. M., Moreno, A., & Whitaker, J. R. (2010). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (VITIS vinifera) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1189–1201.
<http://doi.org/10.1021/jf902939q>
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 76–87. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.001>
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2009). Linking folding and binding. *Current Opinion in Structural Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.12.003>
- Yasuda, D., Takahashi, K., Ohe, T., Nakamura, S., & Mashino, T. (2013). Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: The suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(24), 7709–7714.
<http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.021>